

Aus der Abteilung für Nephrologie

Prof. Dr. Bernhard Banas

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

**Proliferation und Organisation immigrierender Lymphozyten im Rahmen der  
Allograftabstoßung im experimentellen Nierentransplantationsmodell der Ratte**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Marlene Lucia Herrmann

2024



Aus der Abteilung für Nephrologie

Prof. Dr. Bernhard Banas

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

**Proliferation und Organisation immigrierender Lymphozyten im Rahmen der  
Allograftabstoßung im experimentellen Nierentransplantationsmodell der Ratte**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Marlene Lucia Herrmann

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Tobias Bergler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jens Werner

Tag der mündlichen Prüfung:

30.04.2024

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Nierentransplantation allgemein .....	9
1.1.1 Zahlen, Relevanz und Alternativen zur Nierentransplantation .....	9
1.1.2 Indikation zur Nierentransplantation.....	10
1.1.3 Vorbereitungen zur Nierentransplantation .....	11
1.1.4 Transplantatüberleben damals und heute .....	13
1.1.5 Immunsuppression bei Nierentransplantation .....	14
1.1.6 Nachsorge.....	16
1.2 Die Rolle des Immunsystems bei Transplantationen .....	18
1.2.1 Übersicht über das Immunsystem .....	18
1.2.2 Transplantationsimmunologie.....	19
1.3 Transplantatversagen.....	23
1.3.1 Ursachen für Transplantatversagen.....	23
1.3.2 Formen der Transplantatabstoßung.....	24
1.3.3 Therapieansätze bei ABMR .....	27
1.4 Fragestellung .....	30
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Verwendete Geräte und Materialien .....	31
2.2 Projektbeschreibung .....	32
2.3 Weiteres Vorgehen und Färbungen.....	36
2.3.1 Paraffinierung – Fixierung der Präparate und Herstellung der Paraffinschnitte .....	36
2.3.2 Entparaffinierung.....	37
2.3.3 Demaskierung.....	37
2.3.4 Verwendete Antikörper und Färbungsmittel.....	37
2.3.5 Immunhistochemie .....	39

2.3.6	Färbung.....	40
2.4	Auswertung .....	42
2.4.1	Software-basierte Auswertung .....	42
2.4.2	Manuelle Auswertung .....	44
2.4.3	Statistische Auswertung .....	44
2.4.4	Histopathologische Betrachtung.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	T-Lymphozyten – CD3 <sup>+</sup> .....	45
3.1.1	T-Lymphozyten anhand der Gesichtsfelder .....	45
3.1.2	T-Lymphozyten anhand der Infiltrate .....	48
3.2	B-Lymphozyten - CD20 <sup>+</sup> .....	49
3.2.1	B-Lymphozyten anhand der Gesichtsfelder.....	49
3.2.2	B-Lymphozyten anhand der Infiltrate .....	52
3.3	Proliferierende Zellen – Ki67 <sup>+</sup> .....	54
3.3.1	Proliferierende Zellen anhand der Gesichtsfelder .....	54
3.3.2	Proliferierende Zellen Ki67 <sup>+</sup> anhand der Infiltrate.....	56
3.3.3	Proliferierende T- und B-Lymphozyten .....	58
3.3.4	Proliferationsindex .....	59
3.3.5	Proliferation und BANFF-Klassifikation .....	60
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	62
3.5	Organisation der immigrierenden Zellen .....	64
4	Diskussion.....	68
4.1	Beeinflussung immigrierender Zellen .....	68
4.1.1	Einfluss Incompliance bzgl. CyA-Einnahme auf T- und B-Lymphozyten .....	69
4.1.2	Einfluss anti-BAFF-Antikörper Belimumab auf T- und B-Lymphozyten.....	71
4.2	Proliferation, Proliferationsindex .....	77
4.3	Organisation immigrierender Lymphozyten .....	80

4.4	Ausblick und weiterführende Aspekte .....	83
5	Zusammenfassung .....	84
6	Literaturverzeichnis .....	86
7	Anhang.....	103
7.1	Publikation .....	103
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	104
7.3	Tabellenverzeichnis.....	105
7.4	BANFF-Klassifikation .....	106
8	Eidesstattliche Erklärung.....	109
9	Danksagung .....	110
10	Lebenslauf.....	111

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABMR	Antibody Mediated Rejection (Antikörper-vermittelte/ humorale Abstoßung)
AECA	Autoantikörper gegen Endothelzellen
APC	Antigen präsentierende Zelle
APRIL	A proliferation-inducing ligand
AR	Acute Rejection (Akute Transplantatabstoßung)
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BCMA	B-Cell Maturation Antigen
BN	Brown Norway Ratte
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement Dependent Cytotoxicity Assay (Komplement-abhängige Zytotoxizitäts-Analyse)
CKD	Chronic Kidney Disease (Chronische Niereninsuffizienz)
CNI	Calcineurininhibitor
CR	Chronic Rejection (Chronische Rejektion)
CyA	Cyclosporin A
dd-cfDNA	donor- derives cell-free DNA
DGF	Delayed Graft Function
DGfN	Deutsche Gesellschaft für Nephrologie
DSA	Donor-spezifische Antikörper Synonym: Anti-HLA-Antikörper
dnDSA	de novo DSA (neu aufgetretene DSA)
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
d28	Gruppe der Versuchstiere, in der die Nieren an Tag 28 entnommen wurden; CR d28 stellt die „frühe CR“ dar

d56	Gruppe der Versuchstiere, in der die Nieren an Tag 56 entnommen wurden; CR d56 stellt die „späte CR“ dar
eGFR	estimated GFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCXM	Durchflusszytometrische Kreuzprobe
GF	Gesichtsfeld
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HEV	Hochendotheliale Venolen
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IF/TA	Interstitielle Fibrose/ Tubuläre Atrophie
ISO-AK	Iso-Antikörper
IVIG	i.v. Immunglobuline
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcome
LCT	Lymphozyten Toxizitätstest
LEW	Lewis Ratte
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
NAHA	Nicht-akzeptable HLA-Antigendifferenzen
NIH	National Institute of Health
NK	Natürliche Killerzelle
NR	No Rejection (keine Abstoßung)
NTx	Nierentransplantation
PiB	Proliferationsindex B-Lymphozyten
PiT	Proliferationsindex T-Lymphozyten
PRA	Panel-reaktive Antikörper
ROI	Region of Interest

SEM	Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLO	Sekundär Lymphatisches Organ
TCMR	T Cell-Mediated Rejection (T-Zell vermittelte/ zelluläre Abstoßung)
TLO	Tertiär Lymphatisches Organ
TNF	Tumornekrosefaktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Nierentransplantation allgemein

### 1.1.1 Zahlen, Relevanz und Alternativen zur Nierentransplantation

Die Niere ist nach Angaben der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) das am häufigsten transplantierte Organ. In Deutschland konnten im Jahr 2022 1.966 Nierentransplantationen gezählt werden. Hierbei wurden 1.431 Nieren nach postmortaler Spende und 535 Nieren nach Lebendspende transplantiert (1) (siehe Abbildung 1). Im Rahmen der Nierenersatztherapien stellt die Nierentransplantation im Vergleich zu apparativen Nierenersatzverfahren, wie z.B. der Hämodialyse, die erfolgreichere Methode dar. Dieser Erfolg wird anhand der Lebensqualität und dem Langzeitüberleben der PatientInnen gemessen (2,3). So haben PatientInnen nach einer Transplantation eine zwei- bis dreifach erhöhte Lebenserwartung im Vergleich zu PatientInnen auf der Warteliste und somit an der Dialyse (4).

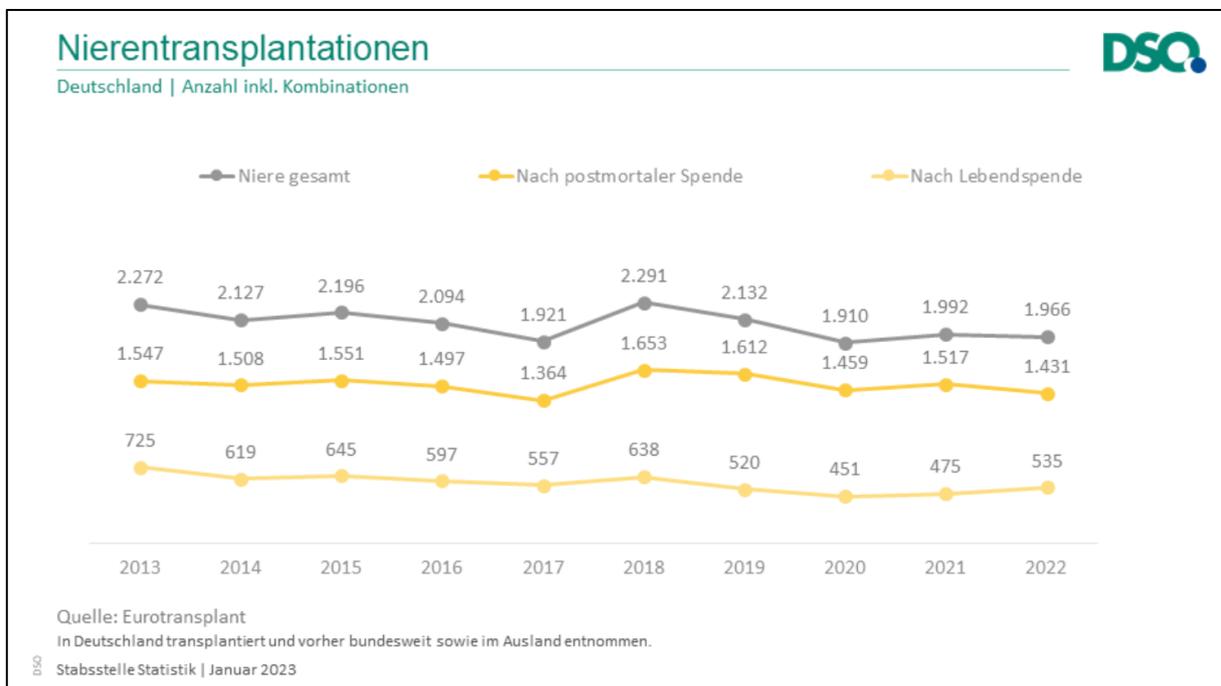


Abbildung 1: Nierentransplantationen in Deutschland 2013-2022 (DSO 2023, Quelle: Eurotransplant (1))

### 1.1.2 Indikation zur Nierentransplantation

Zur Indikationsstellung einer Nierentransplantation muss eine irreversible Nierenfunktionsstörung vorliegen. Auslöser dafür können eine akute oder chronische Niereninsuffizienz sein. Die bekanntesten Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz (engl. chronic kidney disease, CKD) sind unter anderem: vaskuläre hypertensive Nephropathien, Glomerulonephritiden, Zystennieren, diabetische Nephropathien, Systemerkrankungen, interstitielle Nephropathien, sowie chronische Pyelonephritiden (5,6). Eurotransplant gibt jährlich eine Aufstellung über die häufigsten Indikationen, die im vergangenen Jahr zu einer Nierentransplantation führten, bekannt. Im Jahr 2022 war die zystische Nierenkrankheit die am häufigsten verschlüsselte Hauptdiagnose bei Aufnahme auf die Warteliste. Zudem waren das chronisch nephritische Syndrom, der primär insulinabhängige Diabetes mellitus (DM Typ I), das nephrotische Syndrom, angeborene Fehlbildungen der Niere, die chronische tubulointerstitielle Nephritis und rezidivierende und persistierende Hämaturien vertreten (7). Der systemische Lupus Erythematoses wurde 2021 ebenfalls unter den „Top 10“ Indikationen zur Nierentransplantation aufgelistet (8).

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), gemessen in ml/min/1,73m<sup>2</sup> Körperoberfläche, als ein möglicher Parameter herangezogen. Die häufig verwendete estimated GFR (eGFR) gibt dabei eine Schätzung der tatsächlichen GFR an.

Die CKD wird nach der Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) in die folgenden 5 Stadien eingeteilt (9):

Stadium	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	≥90
2	Nierenschädigung mit leicht verminderter eGFR	60 – 89
3a	Leicht - mittelgradige Verminderung der eGFR	45 – 59
3b	Mittelgradig – starke Verminderung der eGFR	30 – 44
4	Starke Verminderung der eGFR	15 – 29
5	Terminales Nierenversagen	< 15

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO

Ab einer GFR  $<60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> spricht man von einer erniedrigten GFR und ab einer GFR  $<15$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> von einem terminalen Nierenversagen. Definitionsgemäß zählen das gleichzeitige Vorhandensein einer GFR von  $<60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> und ein Nierenschaden, welcher anhand einer erhöhten Albuminkonzentration im Urin ( $>30$  mg/g Kreatinin) detektiert werden kann, zu den Kriterien einer chronischen Nierenschädigung. Diese müssen dabei über eine Dauer von drei Monaten bestehen (10). Die CKD betrifft ca. 850.000.000 Menschen weltweit. Es wird vorhergesagt, dass die CKD 2040 die fünfthäufigste Todesursache weltweit sein wird. Die Prävalenz der CKD steigt mit zunehmendem Vorkommen von arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus (11,12). Wenn die CKD zu einer terminalen Niereninsuffizienz fortschreitet, geht sie mit einem erheblichen Risiko von erhöhter Morbidität und Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen einher (13).

Grant et al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass bei PatientInnen mit nicht dialysepflichtiger CKD ein geringerer sozioökonomischer Status zu einem rascheren Voranschreiten der Erkrankung führte (14). Um auf lange Sicht die Prävalenz und die Kosten für das Gesundheitssystem, die mit einer terminalen Niereninsuffizienz einhergehen, zu reduzieren, gilt es mehr Aufklärung auch in weniger privilegierten Gesellschaftsschichten durchzuführen und den Zugang zu medizinischer Hilfe zu erleichtern. Leider werden viele Nierenerkrankungen auch heute noch zu spät erkannt und durch ungenügende Diagnostik, bspw. in Form einer Nierenbiopsie, oder einer ergänzenden humangenetischen Untersuchung, aufgearbeitet.

### **1.1.3 Vorbereitungen zur Nierentransplantation**

Um ein bestmögliches Outcome der PatientInnen nach einer Transplantation zu erreichen, ist es nötig vor diesem Eingriff verschiedene Untersuchungen durchzuführen. Die Abschätzung des immunologischen Risikoprofils der PatientInnen ist dabei essenziell, erfolgt quartalsweise und beinhaltet u.a. die HLA-Typisierung und die Crossmatch-Analyse. In der Transplantationsimmunologie liegt das Augenmerk neben den Blutgruppenantigenen v.a. auf dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-System. Dies ist die Bezeichnung der Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle des Menschen. Der Hintergrund der Untersuchungen ist, dass PatientInnen vor einer anstehenden Transplantation Alloantikörper, sprich Antikörper gegen körperfremde Antigene, entwickelt haben können. Diese richten sich meist gegen humane HLA und begünstigen eine hyperakute Transplantatabstoßung (näheres dazu unter 1.3.2). Sie kommen beispielsweise durch Bluttransfusionen, vorherige Transplantationen oder Schwangerschaften zustande. Daher ist es wichtig vor einer Transplantation mögliche HLA-spezifische

AKs nachzuweisen und eine sog. HLA-Typisierung durchzuführen. HLAs befinden sich auf Chromosom 6. Man unterscheidet generell zwischen HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Antigenen. Zu den HLA-Klasse-I-Antigenen zählen HLA-A, -B und -C. Diese werden auf kernhaltigen Zellen exprimiert. HLA-Klasse-II-Antigene können in HLA-DR, -DP und -DQ untergliedert werden. Sie werden auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC), dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert. Gemeinsam haben HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Antigene, dass sie von Endothelzellen exprimiert werden.

<b>Immunologische Risikoabschätzung vor Nierentransplantation</b>	
HLA-AK-Suche und -Sequenzierung	LCT → misst CDC
	Luminexanalyse
Crossmatch	CDC für T- und B-Lymphozyten
	FCXM für T- und B-Lymphozyten
	Virtuelles Crossmatch

Tabelle 2: Methoden zur immunologischen Risikoabschätzung nach Lindemann (15)

Zur HLA-Antikörpersuche und -Spezifizierung werden der Lymphozyten Toxizitätstest (LCT) und die Luminexanalyse herangezogen. Beim LCT handelt es sich um eine Methode, die über eine Messung der komplementvermittelten Zytotoxizität (Complement dependent Cytotoxicity (CDC)) vonstattengeht. Die Luminexanalyse nimmt die dominierende Rolle ein, um präformierte donorspezifische Antikörper (DSA) zu detektieren und damit die Abstoßung zu verhindern oder zumindest zu verzögern (16). Bei der Luminexanalyse handelt es sich um eine Methode, die mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) vergleichbar ist. Die Luminexanalyse wird jedoch als effizientere Methode bezeichnet, bei der farbkodierte Polystyrolkugeln (sog. Microbeads) verwendet werden, an die HLA-Antigene gekoppelt sind. Mittels Mehrkanal-Durchfluss-Fluorometrie können Antikörper in Protein- und Nukleinsäurehaltigen Proben detektiert, und HLA-AK differenziert werden (17). Erfasste DSA einer bestimmten Signalintensität in der Luminexanalyse (MFI = mean fluorescence intensity) sollten als nicht-akzeptable HLA-Antigendifferenzen (non acceptable HLA antigen mismatch (NAHA)) gesperrt werden, da ihre Anwesenheit zum Zeitpunkt der Transplantation das Abstoßungsrisiko intensiviert und das Transplantatüberleben reduziert (18,19).

In Deutschland ist es richtliniendefinierte Notwendigkeit, vor einer Transplantation eine sog. Verträglichkeitsprobe (Crossmatch) durchzuführen. Die Crossmatch-Untersuchung wurde bereits in den 1960er Jahren eingeführt (20). Die Testung basiert auf der Messung der CDC. Die Kreuzprobe untersucht die Lymphozytenverträglichkeit zwischen den Spender-Lymphozyten (isoliert aus dem peripheren Blut oder der Milz) und dem Empfängerserum nach Zugabe von Komplement. Dabei wird davon ausgegangen, dass die HLA-AK des Empfängers nicht nur gegen das Transplantat, sondern auch gegen die Spenderlymphozyten gerichtet sind. Es werden HLA- und Non-HLA-AK detektiert, die der IgG bzw. IgM-Klasse angehören und das Komplementsystem aktivieren. Gesetzt den Fall, dass es zu einem positiven (T-Zell) Crossmatch-Ergebnis kommt, darf die Transplantation nicht durchgeführt werden. Diese Situation stellt eine absolute Kontraindikation dar. Daneben hat sich die durchflusszytometrische Kreuzprobe (FCXM) etabliert, die eine höhere Sensitivität als der LCT aufweist (21). Die FCXM hat in Deutschland aufgrund des höheren Arbeitsaufwandes und den hohen Kosten im Vergleich zum LCT aktuell jedoch noch keinen standardmäßigen Einstieg in die Diagnostik erlangt. Seit März 2023 zählt zudem das sog. „virtuelle Crossmatch“ zu den notwendigen Untersuchungen vor einer Nierentransplantation im Eurotransplantraum (22). Im Rahmen des virtuellen Crossmatches wird das Empfängerserum, das potenziell anti-HLA-AKs enthält, mit einer Vielzahl systemischer Microbeads zusammengeführt. Jedes Bead ist mit einem Antigen ausgestattet. Sind anti-HLA-AKs im Empfängerserum vorhanden, binden diese an das entsprechende Bead. Durch den Einsatz eines dualen Beamlasers kann diese Bindung und das spezifische Bead detektiert werden. So kann ein Antikörperprofil im Organempfänger erörtert werden und mit der bekannten HLA-Identität des potentiellen Organspenders verglichen werden (23). Vorteile des virtuellen Crossmatches sind die Verkürzung der kalten Ischämiezeit, die vereinfachte Möglichkeit einer landesweiten Zuteilung der Spenderorgane, sowie eine Verkürzung der Wartezeit auf ein Spenderorgan und die Mortalität der PatientInnen auf der Warteliste.

#### **1.1.4 Transplantatüberleben damals und heute**

Das Transplantatüberleben und die damit einhergehende Thematik der Allograftabstoßung ist nach wie vor bedeutender Gegenstand der modernen Medizin und Forschung. Trotz der fortschrittlichen Reduktion der akuten Transplantatabstoßungen im Vergleich zur Anfangszeit der Nierentransplantationsgeschichte in den 1970er Jahren, stellt das chronische Transplantatversagen eine anhaltende Problematik dar. Coemans et al. untersuchten das Kurz- und Langzeit-

überleben der Transplantatnieren zwischen 1986 und 2015 in Europa. Dafür teilten sie den angegebenen Zeitraum in zwei Abschnitte: 1. 1986 – 1999, 2. 2000 – 2015. Im Vergleich wurde sichtbar, dass es innerhalb des gesamten untersuchten Zeitraumes zu einer deutlichen Verbesserung des Transplantatoutcomes kommen konnte. Zwischen 1986 und 1999 war diese Verbesserung jedoch signifikant höher als im zweiten Abschnitt. Zwischen 1986 – 1999 dominierte die Verbesserung des Kurzzeitüberlebens. Zu diesem Ergebnis kamen u.a. auch weitere (amerikanische) Forschungsgruppen (24–26). Die Reduktion der akuten Transplantatabstoßung zeichnete sich vor allem seit der Einführung der Cyclosporin-Therapie zur Reduktion der T-Zell-Aktivierung in den 1980er Jahren ab (27). Außerdem führten eine verbesserte Kontrolle der arteriellen Hypertonie, Anämie, Hypercholesterinämie, Hyperglykämie, ein standardisiertes histologisches Diagnostikverfahren von Nierenbiopsien, eine bessere Diagnostik und Behandlung von Infektionen, ein besseres Management kardiovaskulärer oder urologischer Komplikationen, sowie eine zunehmende Kompetenz der Transplantationsteams zu einer deutlichen Verbesserung des Transplantatüberlebens vor dem Jahr 2000 (28–30). Die weniger eindrucksvolle Optimierung des Transplantatoutcomes nach 2000 erklärten Coemans et al. v.a. durch die zuvor ausgeprägte Verbesserung des Kurzzeitüberlebens und dem veränderten Fokus, der nun auf dem Langzeitüberleben lag (31). Dieser Sachverhalt lässt sich nicht zuletzt dadurch erklären, dass die Pathophysiologie der chronischen Transplantatabstoßung nicht zu genüge verstanden ist und vor allem keine spezifischen therapeutischen Interventionen zur Verfügung stehen.

### **1.1.5 Immunsuppression bei Nierentransplantation**

Seit der Erkenntnis im Jahr 1940 durch Peter Brian Medawar, dass immunologische Faktoren zur Transplantatabstoßung beitragen, versuchen internationale Forschende eine Beeinflussung sowohl der B- als auch der T-Lymphozyten zu etablieren (32). Ziel ist es hierbei das Transplantatüberleben zu optimieren. Im Jahr 1954 führte Prof. Joseph E. Murray (1919-2012) die erste erfolgreiche Nierentransplantation in Boston zwischen zwei eineiigen Zwillingen durch (33,34). Hierdurch wurde die Erprobung, das Immunsystem nach einer Transplantation zu modifizieren, endgültig angestoßen. Zunächst wurde eine Ganzkörper-Röntgenbestrahlung, gefolgt von medikamentösen Methoden verwendet. So wurden durch Murray et al., Calne et al. und Zukoski et al. in den frühen 1960er Jahren erste Erfolge mit dem Immunsuppressivum Azathioprin erreicht (35). Bei Azathioprin handelt es sich um ein Purinanalogen. Es zeichnet sich durch seine Wirkung als Antimetabolit aus. Es hemmt die Synthese der Purinnukleotide und baut anstatt der eigentlich vorhandenen DNA RNA ein. Es hat eine hemmende Wirkung

auf die Differenzierung von Lymphozyten. Zudem wirkt es antiproliferativ auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, NK-Zellen und B-Lymphozyten, und hemmt die Sekretion des Wachstumsfaktors TNF- $\alpha$ .

Bei der immunsuppressiven Therapie nach Nierentransplantation ist generell zwischen einer Induktions-, Erhaltungs- und Abstoßungstherapie zu unterscheiden. Die Induktionstherapie stellt die Therapie vor, während und in den ersten Wochen nach Transplantation dar. Sie dient der sofortigen Etablierung einer effektiven Immunsuppression. Durch die Induktionstherapie soll die T-Zell-Antwort zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation vermindert bzw. moduliert, und somit eine akute Abstoßung des Transplantats verhindert werden (36). Internationale Grundlagen zur Diagnostik und Therapie sowohl einer akuten als auch einer chronischen Transplantat-abstoßung legt die KDIGO fest (37). Laut den KDIGO-Leitlinien beinhaltet die Induktionstherapie folgende Substanzen:

1. Glukokortikoide,
2. Calcineurininhibitor (CNI; Tacrolimus oder Cyclosporin A),
3. Interleukin-2-Rezeptor-Antagonisten (Basiliximab).

In zahlreichen Studien wurde die Wirksamkeit von IL-2-Rezeptor-Antagonisten gegenüber Placebos belegt (38). Sollte der Organempfänger ein intensiviertes immunologisches Risikoprofil aufweisen (z.B. Re-Transplantation, präexistente DSAs), wird statt eines IL-2-Rezeptor-Antagonisten ein lymphozytendepletierender Antikörper (z.B. Antithymozytenglobulin ATG) empfohlen.

Die darauffolgende Erhaltungstherapie stellt die Langzeitimmunsuppression dar und besteht aus einem CNI und Antimetabolite, sprich eine antiproliferativ aktive Substanz (Azathioprin oder Mycophenolate MMF) oder mTOR-Inhibitoren (Sirolimus oder Everolimus)  $\pm$  Glucocorticoide (bspw. Prednisolon). Dieses Schema gilt für PatientInnen ohne Risikofaktoren für eine akute Organabstoßung. Glucocorticoide werden jedoch auch bei PatientInnen mit einem erhöhten immunologischen Risikoprofil oder einem erhöhten Risiko einer Rekurrenz der Grunderkrankungen eingesetzt. Ansonsten versucht man bestmöglich auf deren Einsatz zu verzichten, um die damit einhergehenden Nebenwirkungen zu reduzieren (39). Von der KDIGO wird der Einsatz von Tacrolimus als primärer CNI empfohlen. Die CNI-Therapie sollte vor, bzw. während der Transplantation und somit ohne Verzögerung begonnen werden. Cyclosporin A ist ein zyklisches Polypeptid, Tacrolimus ein Makrolidderivat. Nachdem sie in die Zelle aufgenom-

men wurden, binden sie an Immunophiline im Zytosol. Sie sind in der Lage die T-Zell-Aktivierung zu inhibieren. Die Erhaltungstherapie hat zum Ziel die zur Induktionstherapie verwendete Medikation in ihrer Dosis zu reduzieren. So soll eine Reduktion der Nebenwirkungen bei aufrechterhaltener Immunsuppression stattfinden (40). Die CNI-freie Erhaltungstherapie mittels Ko-Stimulationsblockern (Belatacept) stellt dahingehend ein mögliches Konzept dar. In zwei randomisierten, kontrollierten Phase-III-Studien „BENEFIT“ und „BENEFIT-EXTend“ wurde das Outcome der PatientInnen verglichen, die mit einem Immunsuppressivum, entweder Belatacept oder Cyclosporin A, behandelt wurden. Die PatientInnen, die mit Belatacept statt CyA behandelt wurden, wiesen (auch nach 5 Jahren) eine höhere GFR auf (41,42). Belatacept ist ein Biological, das die Interaktion zwischen dem Antigen CD28 und CD80/86 hemmt. Es wirkt als Kostimulationsinhibitor auf T-Lymphozyten. Ein besorgniserregender Punkt ist jedoch, dass es unter Belatacept im Vergleich zur Standardimmunsuppression zu einer erhöhten Anzahl akuter Transplantatabstoßungen kommt. Die Therapie mit Belatacept erscheint geeignet, wenn schwere CNI-induzierte Nebenwirkungen, wie z.B. eine thrombotische Mikroangiopathie auftreten (43).

Die individuell notwendige Dosis der Immunsuppressiva wird bspw. anhand der Talspiegel im Vollblut ermittelt. Die angestrebten Zielspiegel variieren je nach immunologischem Risikoprofil und Individuum. Zu beachten bleibt, dass sich die immunsuppressive Therapie auf das gesamte Immunsystem auswirkt. Somit steigt das Risiko für opportunistische Infektionen, wie z.B. Zytomegalievirus (CMV) und Malignome, wie z.B. Melanome, Kaposi-Sarkome oder lymphoproliferative Erkrankungen (44).

### **1.1.6 Nachsorge**

Zur frühzeitigen Detektion von subakuten Abstoßungsreaktionen und zur Vermeidung von unzuverlässiger Immunsuppressivaeinnahme gilt es die PatientInnen im ambulanten Setting nachhaltig zu begleiten. So werden nach erfolgter Nierentransplantation im mittelfristigen Verlauf alle drei Monate zur Beurteilung der Nierenfunktion u.a. Urinparameter, DSAs, und die Talspiegel der Immunsuppressiva im Serum bestimmt (45). Zudem findet eine sonographische Kontrolle der Nieren statt.

Es finden nach und nach immer mehr Kriterien zur Erfassung einer Transplantatabstoßung Einzug in den Klinikalltag. So z.B. die Einführung des C4d-Markers in der Nephropathologie. Hierbei handelt es sich um einen Marker der klassischen Komplementaktivierung. Seit dessen

Einführung wurden deutlich mehr ABMR diagnostiziert (46). Bei der Bestimmung von C4d ist jedoch ebenfalls eine Biopsie des Transplantates von Nöten. U.a. durch Haas et al. wurde gezeigt, dass es zahlreiche Fälle einer C4d negativen ABMR gibt. Im Jahr 2013 wurde die C4d negative ABMR in die BANFF-Klassifikation aufgenommen (47). Aktuell laufen zahlreiche Studien zu nicht-invasiven Diagnostikmethoden einer zellulär oder humoral vermittelten Transplantatabstoßung. Zur Detektion einer akuten Rejektion (AR) werden diagnostische Methoden wie die Detektion von HLA- und non-HLA-AKs, Genexpressionen im Blut (kSORT), mRNA (z.B. Perforin) und Chemokine im Urin (CXCL9 und CXCL10) im Rahmen von Studien erprobt (45,48,49). Das sog. „molekulare Mikroskop“ scheint eine vielversprechende Möglichkeit in der Detektion einer subklinischen Allograftabstoßung zu sein. Hierbei wird zur Abgrenzung unterschiedlicher immunologischer Veränderungen sowohl eine Gewebeprobe untersucht als auch eine Markeranalyse durchgeführt. Halloran et al. verglichen in der „*TRIFECTA*-Studie“ die Genexpression in insgesamt 300 entnommenen Nierenbiopsien mit donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) in korrespondierenden Plasmaproben. Die Plasmaproben wurden unmittelbar vor der jeweiligen Biopsie entnommen. Durch die Bestimmung von dd-cfDNA nach Organtransplantation kann eine Identifizierung und Charakterisierung des Transplantatschadens erfolgen (50). Bei dd-cfDNA handelt es sich um exogene DNA, welche von beschädigten Zellen des Spenderorgans ausgeht. Diese zirkuliert im Blut des Empfängers und kann über eine Blutentnahme detektiert werden (51). Nach einer Transplantation kommt es initial auch ohne akute frühe Abstoßung zu einem Anstieg der dd-cfDNA Konzentration. Kommt es tatsächlich zu einer Transplantatabstoßung, geht diese jedoch mit einer fünf Mal höheren dd-cfDNA-Konzentration einher (52). Halloran et al. konnten zeigen, dass der prozentuale Anteil von dd-cfDNA zum Zeitpunkt einer indizierten Transplantatbiopsie stark mit einer aktiven molekularen Abstoßung korrelierte (53).

## 1.2 Die Rolle des Immunsystems bei Transplantationen

Um die Mechanismen, die sich nach erfolgter Transplantation abspielen nachvollziehen zu können, ist ein Blick auf den Aufbau des Immunsystems und die Transplantationsimmunologie nötig.

### 1.2.1 Übersicht über das Immunsystem

Zunächst gilt es, zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem zu unterscheiden. Das angeborene Immunsystem wird aktiv, indem es über keimbahnkodierte, nicht klonale Rezeptoren Pathogene erkennt, und diese eliminiert. Hierzu zählen: natürliche Killerzellen (NK), Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Mastzellen und Epithelzellen. Eine wichtige Rolle nehmen die dendritischen Zellen, auch Antigen-präsentierende Zellen (APC) genannt, ein. Sie nehmen fremde Antigene auf, und präsentieren die Peptidfragmente den unterschiedlichen T-Zellen. Sie sind sowohl für die angeborene Immunität (durch Zytokinproduktion), als auch für die adaptive Immunantwort (durch Antigenpräsentation für T-Zellen) wichtig. Zum adaptiven Immunsystem werden T- und B-Lymphozyten gezählt, welche Antigene erkennen können. T-Lymphozyten, die sich wiederum in u.a.  $CD4^+$  T-Helferzellen,  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen untergliedern lassen, reifen im Thymus aus und sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Die überwiegende Mehrheit der zirkulierenden T-Zellen exprimieren den T-Zellrezeptor CD3. Dieser CD3-Marker wird meist benutzt, um die gesamte T-Zellzahl, inklusive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Zellen, mittels Durchflusszytometrie zu ermitteln. B-Lymphozyten entspringen im Knochenmark ebenso aus der  $CD34^+$  multipotenten Stammzelle. Sie tragen membrangebundene Immunglobuline (auch Antigenrezeptoren genannt) und können nach Antigenkontakt Antikörper sezernieren. Außerdem exprimieren sie Rezeptoren für aktivierte Komplementproteine (z.B. C3d oder CD21) und können als Antigen-präsentierende Zellen tätig werden. Im Laufe der Zeit differenzieren sie aus den Vorläuferzellen des Knochenmarks zu reifen B-Lymphozyten. Zu den Aufgaben der B-Lymphozyten gehören: der Schutz des Körpers vor fremden Antigenen, die Präsentation dieser Antigene für die antigenspezifischen T-Lymphozyten und die Antikörperproduktion (54). T-Lymphozyten können Antigene nur erkennen, wenn diese in Peptidfragmente gespalten wurden und an MHC-I- oder MHC-II-Moleküle gebunden sind. Wohingegen B-Lymphozyten Antigene über ihren Antigenrezeptor detektieren können.

## 1.2.2 Transplantationsimmunologie

Da bei einer allogenen Transplantation ein sich genetisch vom Empfänger unterscheidendes Organ transplantiert wird, wird das körpereigene Immunsystem des Organempfängers aktiviert und versucht das fremde Organ abzustößen. Hierbei richtet sich das Immunsystem des Empfängers gegen präformierte Alloantigene des Transplantats (55). Vereinfacht ist diese Reaktion mit der Bekämpfung körperfremder Bakterien oder Viren durch den menschlichen Organismus vergleichbar. Um diese Immunreaktion, und die daraus resultierende Transplantatabstoßung zu verhindern, bzw. abzuschwächen, erfolgt der Einsatz von immunsuppressiven Medikamenten (vgl. 1.1.5).

In der folgenden Abbildung wird der Einfluss der Lymphozyten auf das Transplantat dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass B-Lymphozyten das Transplantat über drei Wege beeinflussen können:

1. über den direkten Weg. Dieser kann beispielsweise durch eine Transplantatschämie initiiert werden.
2. über die Beeinflussung der T-Zell-Antwort. Das geschieht durch eine Kombination aus Antigenpräsentation, Zytokinproduktion und Costimulation der T-Lymphozyten.
3. über die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (56).

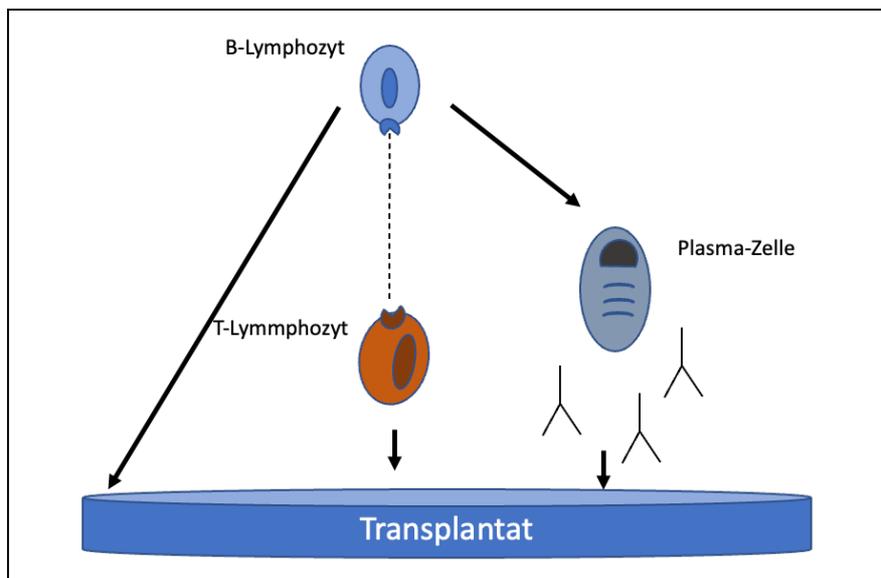


Abbildung 2: B-Lymphozyten Einfluss auf das Transplantat. Abb. nach Schmitz et al. (56)

### 1.2.2.1 Immigration

Blutleukozyten sind dazu befähigt durch die verschiedenen Kompartimente des Körpers zu wandern. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet. Leukozyten immigrieren jedoch aus unterschiedlichen Gründen, z.B. im Rahmen der Infektabwehr pathogener Bakterien oder Viren, oder aber bei einer Abstoßungsreaktion nach stattgefundenener Transplantation. Die Einwanderung in verschiedene Gewebe, sog. Immigration, kann auf unterschiedlichen Wegen vonstattengehen. Von Inflammation spricht man, wenn sich Zellen des erworbenen Immunsystems an einem Ort anreichern. Normalerweise zirkulieren Leukozyten im Blutstrom, ohne sich an Gefäßwände zu haften. Im Falle einer Inflammation wird das Endothel aktiviert und die Leukozyten können über drei Schritte durch die Gefäßwand in das Gewebe eindringen.

1. Rolling, initiiert durch Selektine,
2. Aktivierung, initiiert durch Chemokine,
3. Arrest, initiiert durch Integrine (57).

Das sog. „Rolling“, die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten wurde bereits im 19. Jahrhundert von Pathologen beschrieben. Die Entdeckung der Integrine, Selektine und Chemokine führte zu dem Anschein, dass die Leukozyten-Adhäsionskaskade als Mechanismus fungiert, um Leukozyten an spezielle Orte zu bringen. Ursprünglich ging man davon aus, dass dieser Mechanismus wie oben genannt in drei Schritten vonstattengeht. Aktuellere Studien zeigen jedoch, dass der Prozess in weiteren Schritten, welche noch nicht gänzlich verstanden werden, abläuft (58,59):

1. „Einfangen von Leukozyten“,
2. Rollen, initiiert durch Selektine,
3. Langsames Rollen, ebenfalls durch Selektine ausgelöst,
4. Aktivierung durch Chemokine,
5. Arrest durch Integrine und intrazelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMI), vaskuläre Zell-Adhäsionsmoleküle (VCAMI) initiiert,
6. Adhäsion, Stärkung und Ausbreitung, initiiert durch Kinasen,
7. Intravaskuläres Gleiten, durch Makrophagen Antigene (MAC1) und ICAM1 ausgelöst,
8. Parazelluläre und transzelluläre Transmigration (57).

Hierbei kommt es zunächst zu einer lockeren Haftung der Leukozyten an der Gefäßwand. Dieser Schritt wird durch P- oder E-Selektin, welche von aktivierten Gefäßoberflächen ausgeschüt-

tet werden, eingeleitet. Selektine und Integrine sind auch für das Rollen, sowie das anschließende langsame Rollen der Leukozyten zuständig. Arrest während dem Rollen wird durch Chemokine ausgelöst und durch die Bindung von Leukozytenintegrinen an Mitglieder der Immunoglobulinfamilie wie ICAM und VCAM gefördert. ICAM und VCAM werden von Endothelzellen exprimiert (60,61). Integrine vermitteln die Adhäsion der Lymphozyten an die Gefäßwand. Sie generieren zudem intrazelluläre Signale, die zur Regulation von zellulären Funktionen, wie bspw. Zellbeweglichkeit, Proliferation und Apoptose, beitragen (62,63). V.a. Neutrophile und Monozyten gleiten innerhalb der Gefäße und suchen die Gefäßwand mit Hilfe von MAC1 und ICAM1 nach einem geeigneten Ort zur Transmigration der Leukozyten ab (64,65). Die Transmigration von Leukozyten durch die postkapillären Venenwände stellt den letzten Schritt der Immigration von Leukozyten in das entzündete/aktivierte Gewebe dar.

### 1.2.2.2 Proliferation

Zellproliferation, oft auch nur Proliferation (lateinisch *proles* ‚Nachwuchs, Sprößling‘ und *ferre* ‚tragen‘) genannt, ist die Bezeichnung für schnelles Wachstum bzw. Vermehrung von Gewebe (66). In der Zellbiologie versteht man unter proliferierenden Zellen diejenigen, die sich selbst replizieren, sodass deren Anzahl zunimmt. Dieser Mechanismus findet unter kontrollierten Bedingungen auch in gesunden Geweben wie bspw. während der Wundheilung in der Haut statt. Im Kontext der Nierentransplantation ist dieser Begriff auf die Immigration von Zellen des Immunsystems im Rahmen der Transplantatabstoßung zu beziehen. Die einwandernden B- und T-Lymphozyten werden durch Reize zum Wachstum bzw. deren Vermehrung angeregt. Bei diesen Reizen handelt es sich u.a. um Antigenpräsentation durch B-Lymphozyten gegenüber den T-Lymphozyten. Bspw. BAFF (B-Zell-aktivierender Faktor, auch Blys, TALL-1) gehört zu den Tumornekrosefaktoren und ist für seine stimulierende Wirkung auf B-Lymphozyten bekannt (67). Er wird v.a. von Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert und hat die Möglichkeit an drei Rezeptoren auf den B-Zellen zu binden. Hierzu zählen der BAFF-Rezeptor, TACI (Transmembrane activator and CAML interactor) und BCMA (B-cell maturation Antigen). Die Bindung an BCMA in normalen Zellen geschieht, um das Zellüberleben, die Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion zu ermöglichen bzw. zu fördern (68). Eine Überexprimierung von BAFF wurde außerdem bei autoimmunen Geschehen im Rahmen des Lupus erythematoses (SLE) oder dem multiplen Myelom beobachtet. In diesen Bereichen macht man sich den BAFF bereits als therapeutischen Angriffspunkt zunutze.

### 1.2.2.3 Tertiär lymphatische Organe (TLOs)

Im Rahmen der Inflammation folgen die immigrierenden Immunzellen Mechanismen, welche denen in sekundär lymphatischen Organen (SLO) sehr ähneln. Zu den SLO zählen u.a. Lymphknoten und die weiße Pulpa der Milz. Auch die Mikroarchitektur der TLOs ähnelt derer der SLOs. Der Unterschied ist, dass sich die TLOs im Vergleich zu den SLOs in chronisch inflammatorischen Organen finden (69). TLOs entstehen durch eine anhaltende Antigenstimulation. Die Ausprägung der TLOs mit Keimzentren und hochendothelialen Venolen (HEV) ist stark abhängig vom Krankheitsstatus und der Dauer der Antigenexposition (70). Diese Art der Zellgruppierung wurde u.a. bei Krebs- und Autoimmunerkrankungen beschrieben. Da es PathologInnen möglich ist, diese Bereiche zu identifizieren und zu lokalisieren, sind sie als Angriffspunkte therapeutischer Maßnahmen Gegenstand der Forschung (71).

Zu den 6 Definitionskriterien eines TLOs gehören (72):

1. Vorhandensein organisierter immigrierter T- und B-Lymphozyten,
2. Auftreten von T-Zell-Zonen (organisiertes Netzwerk aus retikulären Fibroblasten),
3. Vorhandensein von HEV in der T-Zellzone,
4. Nachweis von B-Zell-Klassenwechsel und Keimzentrum innerhalb der B-Zellfollikel,
5. Vorhandensein von aktivierungsinduzierter Cytidin-Desaminase, welche zur Ausreifung hochspezifischer Antikörper fungiert (73), sowie
6. Vorhandensein von follikulär dendritischen Zellen.

Der Fall, dass nicht alle genannten sechs Kriterien zutreffen, man aber dennoch von einem TLO spricht, ist keine Seltenheit. Dies ist möglich, da die organisierte Struktur trotzdem als TLO fungiert. Die pathophysiologische Signifikanz der TLOs scheint bisher noch ungeklärt (74).

## 1.3 Transplantatversagen

Im Rahmen der Immigration von Lymphozyten in das transplantierte Organ kann es zu Abstoßungsreaktionen kommen. Mögliche Ursachen für unterschiedliche Formen der Transplantatabstoßung, sowie Therapieansätze werden im Folgenden dargestellt.

### 1.3.1 Ursachen für Transplantatversagen

Bei den Ursachen für Transplantatversagen unterscheidet man generell zwischen spender- und empfängerassoziierten bzw. immunologischen und nicht-immunologischen Ursachen.

Immunologische Ursachen für ein Transplantatversagen stellen u.a. präformierte (donorspezifische) Antikörper (DSA), eine hohe Anzahl an HLA-Mismatches, ein positives B-Zell-Crossmatch, sowie eine ABO-Inkompatibilität dar. Diese immunologischen Faktoren können zu einer TCMR und/oder ABMR führen, was im Folgenden genauer ausgeführt wird.

Nicht-immunologische Ursachen einer Transplantatabstoßung seitens des Organspenders stellen bspw. dessen Alter, kardiovaskuläre Erkrankungen und Organischämien dar. Einflussfaktoren des Organempfängers sind dahingegen das Vorhandensein von Diabetes mellitus, Arterieller Hypertonie, Dyslipidämie, postrenale Faktoren wie Reflux oder Stenosierungen, kardiorrenale und prärenale Faktoren, virale Infektionen und Medikamentennephrotoxizität (z.B. durch Calcineurininhibitoren etc.). Ein weiterer nicht-immunologischer Risikofaktor, welcher den Erfolg einer Nierentransplantation beeinträchtigen kann, ist u.a. eine rekurrende renale Grunderkrankung, bzw. Glomerulonephritis, die sich in Form einer fokal segmentalen Glomerulosklerose, einer membranproliferativen Glomerulonephritis Typ I + II, einer IgA-Nephritis, einer membranösen Glomerulonephritis, eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS), einer Purpura-Schönlein-Henoch, einer gemischt essenziellen Kryoglobulinämie oder einer fibrillären Glomerulosklerose äußern kann (6). Nicht zu unterschätzen ist die Incompliance des Organempfängers bzgl. der immunsuppressiven Therapie, sowie eine iatrogen bedingte inadäquate Immunsuppression. Wiebe et al. konnten zeigen, dass Nonadhärenz ein Risikofaktor für die Entstehung von dnDSA darstellt und es in der Folge häufig zu einer gemischten TCMR und ABMR kommt. Sie zeigten, dass sich die Auswirkungen der Incompliance bereits 6 Monate nach erfolgter Transplantation bemerkbar machen können (75). So konnten auch Chisholm et al. ab dem sechsten Monat nach Transplantation eine Abnahme der Adhärenz bzgl. der Immunsuppressivaeinnahme beobachten. In deren Studie, in der 500 PatientInnen eingeschlossen waren, lag die Therapieadhärenz in den ersten fünf Monaten nach Transplantation bei 95%. Nach

12 Monaten nahmen nur noch 48% der PatientInnen zuverlässig Ihre immunsuppressive Medikation ein (76). Vorangegangene Transplantatabstoßungen stellen neben einer verzögerten Funktionsaufnahme des Transplantats (DGF, delayed graft function) einen nennenswerten nicht-immunologischen Risikofaktor dar. Eine DGF wird durch ein hohes Alter des Organspenders, eine verlängerte kalte Ischämiezeit, sowie kardiovaskuläre Erkrankungen des Organspenders begünstigt (77–80).

### **1.3.2 Formen der Transplantatabstoßung**

Neben der ehemaligen zeitlichen Einteilung einer Transplantatabstoßung in hyperakut, akut und chronisch, besteht der Goldstandard in der Klassifikation auf histopathologischer Ebene. Diese wird anhand der „BANFF-Klassifikation“ für Nieren klassifiziert (81). Die BANFF-Konferenz, welche seit 1997 alle zwei Jahre tagt, ist für die kontinuierliche Überarbeitung der diagnostischen Kriterien einer Transplantatabstoßung zuständig. Die BANFF-Klassifikation in ihrer zuletzt 2019 überarbeiteten Version befindet sich zum leichteren Verständnis als Ergänzung im Anhang.

Man unterscheidet zwischen einer zellulären und humoralen Immunantwort. Die beiden Abstoßungsformen sind anhand der Lokalisation der Schädigung histologisch, und des Vorhandenseins von Antikörpern serologisch voneinander unterscheidbar (84).

#### **1.3.2.1 Zelluläre Immunantwort – TCMR**

Bei der zellulären Immunantwort handelt es sich um eine durch T-Lymphozyten vermittelte Abwehrreaktion. Nachdem das Immunsystem des Empfängers mit körperfremden Antigenen (HLA) des Transplantats in Kontakt kommt, werden unreife dendritische Zellen aktiviert und tragen Spenderantigene des transplantierten Organs zum Empfänger. Hier erreichen diese die Lymphknoten und die Milz. Auf deren Weg reifen sie zu Antigenpräsentierenden Zellen (APC) aus (82). Sie präsentieren das Spenderantigen über MHC I an ihrer Oberfläche. Dieser MHC I wird durch CD8 und den T-Zell-Rezeptor auf T-Killerzellen gebunden. Zusätzlich zu den T-Lymphozyten unterstützen Phagozyten, NK, T-Helferzellen und B-Lymphozyten den Prozess der zellulären Immunantwort (83).

Die akute TCMR setzt zwischen der ersten Woche und mehreren Monaten nach erfolgter Transplantation ein. Als Ursache für die akute Rejektion eines Nierentransplantates gelten u. a. HLA-Inkompatibilität, Retransplantation, sowie das Alter des Patienten (84). Im jährlichen Report

der USA lag der Anteil der akuten Transplantatabstoßungen innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation 2020 bei Erwachsenen zwischen 5,3 – 9,3 % (85).

Diese Form der Transplantatabstoßung ist histologisch durch die lymphozytäre Infiltration der Tubuli (Tubulitis = Grad 4 I nach BANFF), des Interstitiums und der arteriellen Intima (Endothelialitis = Grad 4 II nach BANFF) charakterisiert (86). Die alleinige akute TCMR spricht i.d.R. gut auf eine intensiviertere immunsuppressive Therapie an uns spielt somit prognostisch mittlerweile eine untergeordnete Rolle. So ist diese nach Empfehlung der KDIGO mit einer hochdosierten Steroid-Bolusgabe zu therapieren. Bei steroidrefraktären und rekurrenten akuten zellulären Abstoßungen oder histologisch höhergradigen Abstoßungen erfolgt der Einsatz von Lymphozyten-depletierenden Wirkstoffen (z.B. ATG) oder OKT3 (87). Bei OKT3 handelt es sich um einen monoklonalen AK, der gegen humane T-Zellen gerichtet ist.

Neben der akuten TCMR wird seit dem Update der Banff-Klassifikation aus dem Jahr 2005 auch die chronisch aktive TCMR aufgeführt. Histologische Merkmale sind eine Interstitielle Fibrose/Tubuläre Atrophie (IF/TA), vaskuläre Fibrose mit Intimaverdickung, eine Verdickung der glomerulären Basalmembran, Hyalinisierung der Arteriolen und deren Verdickung. Eine Therapie ist derzeit nicht bekannt. Generell spricht man von einer chronischen Transplantatabstoßung, wenn es nach über einem Jahr nach erfolgter Transplantation zu einer Abstoßungsreaktion kommt. Sie kann sowohl durch zelluläre, als auch humorale Mechanismen, sprich antikörpervermittelt (ABMR=Antibody mediated rejection), ablaufen (88), oder als Kombination aus beiden (= gemischt-zellige Abstoßung).

### **1.3.2.2 Humorale Immunantwort – ABMR**

Im Rahmen der humoralen Immunantwort differenzieren B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche DSA produzieren. Diese DSAs binden an HLA der Endothelzellen des Transplantats, binden Komplement und lösen eine Kaskade aus, welche letztendlich zur Freisetzung von C5 führt. Bei C5 handelt es sich um eine Komplementkomponente, welche neben den Faktoren C1-C9 zur Aktivierung des Membranangriffskomplexes (MAC) führt. Somit kommt es zum Zelltod und in unserem Falle zur Schädigung des Transplantats (89). Die Datenlage über den Zeitpunkt, zu dem sich DSA entwickeln, ist derzeit sehr widersprüchlich. So sind einige Forschende der Meinung, dass sich DSA bereits wenige Monate (<6 Monate) nach stattgefundener Transplantation entwickeln (90), Andere zeigen wiederum Daten auf, dass eine DSA-Detektion erst nach mehreren Jahren möglich ist (91,92).

Lange Zeit hing die Diagnosestellung einer ABMR von 3 Faktoren ab: 1. DSA-Nachweis, 2. Histologischer Nachweis einer akuten Allograftschädigung (z.B. durch mikrozirkulatorische Inflammation), sowie 3. Nachweis von Antikörperinteraktion mit dem Gefäßendothel (z.B. C4d-Nachweis innerhalb der peritubulären Kapillaren) (93).

Aufgrund der geringen Sensitivität von C4d und der damit einhergehenden Unterdiagnostik einer ABMR wurde im Rahmen des 12. Banff-Updates von 2013 die C4d negative ABMR in die Diagnosekriterien der Banff-Klassifikation aufgenommen. Die zahlreichen Änderungen der Banff-Klassifikation führten über die Jahre zu einem komplexen diagnostischen System, welches seinen ursprünglichen klinischen Nutzen zu verfehlen droht (94). Anhand des letzten Updates von 2019 wird zwischen akuter/aktiver, chronisch aktiver und chronisch inaktiver ABMR unterschieden. Zum besseren Verständnis erfolgt die Unterteilung im Folgenden dennoch in hyperakut, akut und chronisch.

Die hyperakute Abstoßung eines Transplantats setzt Minuten nach erfolgter Reperfusion, sprich meist unmittelbar nach Freigabe des Blutstroms des Organempfängers, ein. Dabei sind seitens des Organempfängers bereits vor stattgehabter Transplantation Antikörper gegen HLA-Antigene, welche im Spenderorgan enthalten sind, vorhanden. Die HLA-Antigene haben sich in den meisten Fällen während einer Schwangerschaft, einer Bluttransfusion oder einer vorangegangenen Transplantation gebildet. Die hyperakute Rejektion ist durch Thrombosierungen der Gefäße, welche zu nekrotischen Veränderungen des Transplantats führen, charakterisiert (55). So erkennt man eine hyperakute Abstoßung bereits makroskopisch daran, dass das Transplantat marmoriert, düster bzw. schwarz erscheint, sobald die Revaskularisation im Rahmen der Organimplantation sichergestellt ist. Dank der modernen o.g. immunologischen Analysemethoden sind hyperakute Abstoßungen heutzutage eine absolute Rarität.

Die akute antikörpervermittelte Abstoßung (ABMR) kann innerhalb weniger Tage bis Jahre nach erfolgter Transplantation auftreten. Zur Differenzierung zwischen akuter TCMR und ABMR ist der Nachweis von DSA, sowie eine Biopsieentnahme entscheidend. Eine akute ABMR tritt v.a. auf, wenn bereits vor der Transplantation zirkulierende DSA vorhanden waren. Somit gehen hohe DSA-Titer vor Transplantation mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine akute Transplantatabstoßung einher (95). Die akute ABMR ist normalerweise klinisch apparent.

Histopathologisch ist die ABMR durch folgende Aspekte geprägt (54,89):

1. fibrinoide Nekrose der Arteriolen,
2. Fibrinthromben in glomerulären Kapillaren,
3. Glomerulitis,
4. peritubuläre Kapillaritis,
5. interstitielle Hämorrhagien und
6. die Anfärbung der peritubulären Kapillaren mittels C4d-Bindung.

Die chronische ABMR ist die dominierende Art der Transplantatabstoßungen im Langzeitverlauf und steht auch im Fokus dieser Arbeit. Sie setzt nach mehr als einem Jahr nach erfolgter Transplantation ein. Diese Art der Organabstoßung macht sich klinisch meist durch eine neu aufgetretene Albuminurie, Hypertension bzw. durch das Vorhandensein von de novo DSA, sprich neu aufgetretenen donorspezifischen Antikörpern und einem (schleichenden) Transplantatfunktionsverlust bemerkbar. Die Hauptrisikofaktoren eines reduzierten Langzeitüberlebens stellen das Vorhandensein von DSA oder dnDSA dar (96,97). So unterscheidet man zwischen der Persistenz bzw. dem Wiederauftreten bereits vor der Transplantation existierender DSA oder beides, und de novo, sprich neu aufgetretene, DSAs, welche gewöhnlich ca. frühestens ein Jahr nach einer Transplantation auftreten (98). Russell et al. beschrieben bereits 1970 den Zusammenhang zwischen der Entstehung von dnDSA und der Entwicklung einer chronischen Nierentransplantatarteriopathie (98). Die damit einhergehende chronische Allograftabstoßung konnte seither durch weitere Forschungsgruppen belegt werden (99,100). In Fällen, in denen eine Nierenbiopsie nicht möglich ist, kann die Bestimmung von dnDSA Titern zur Risikoabschätzung einer ABMR herangezogen werden (101). Diese Bestimmung kann die Nierenbiopsie jedoch nicht ersetzen.

Die histologischen Merkmale der chronischen ABMR können denen der chronisch aktiven TCMR (s.o.) entsprechen.

### **1.3.3 Therapieansätze bei ABMR**

Im Rahmen der Banff-Konferenz 2019 wurde ersichtlich, dass die chronisch aktive ABMR ein breites Spektrum umfasst. So reicht dies von schwerwiegender Aktivität und milder Chronizität bis zu Fällen mit geringer Aktivität und schwerer Chronizität. Eine chronische Transplantatabstoßung ist mit einer erhöhten Morbidität, Mortalität, sowie mit hohen Kosten verbunden (102). Bei antikörpervermittelten Abstoßungen empfiehlt die KDIGO mit einer oder mehreren der

folgenden Alternativen ± Glucocorticoide zu behandeln: Plasmapherese, i.v. Immunglobuline (IVIG), Anti-CD20-Antikörper, Lymphozyten-depletierende Antikörper (87). Zur Bekämpfung der späten und/oder chronischen ABMR konnten trotz zahlreicher kleiner randomisierter, kontrollierter Studien bisher leider noch keine bahnbrechenden Ergebnisse erzielt werden. Die untersuchten Therapiemethoden fanden daher bisher keinen Einzug in den klinischen Alltag (103,104). Prinzipiell stellt die aktuelle Zielsetzung der Therapie einer akuten/aktiven und chronisch, aktiven antikörpervermittelten Abstoßung die Elimination bereits vorhandener Antikörper bzw. die Unterbindung der erneuten Entstehung von Antikörpern dar.

In der folgenden Abbildung 3 von Böhmig et al. wird die Pathogenese der ABMR verdeutlicht. Zudem sind potenzielle Angriffspunkte dargestellt. Nachfolgend soll auf einige Substanzen eingegangen werden.

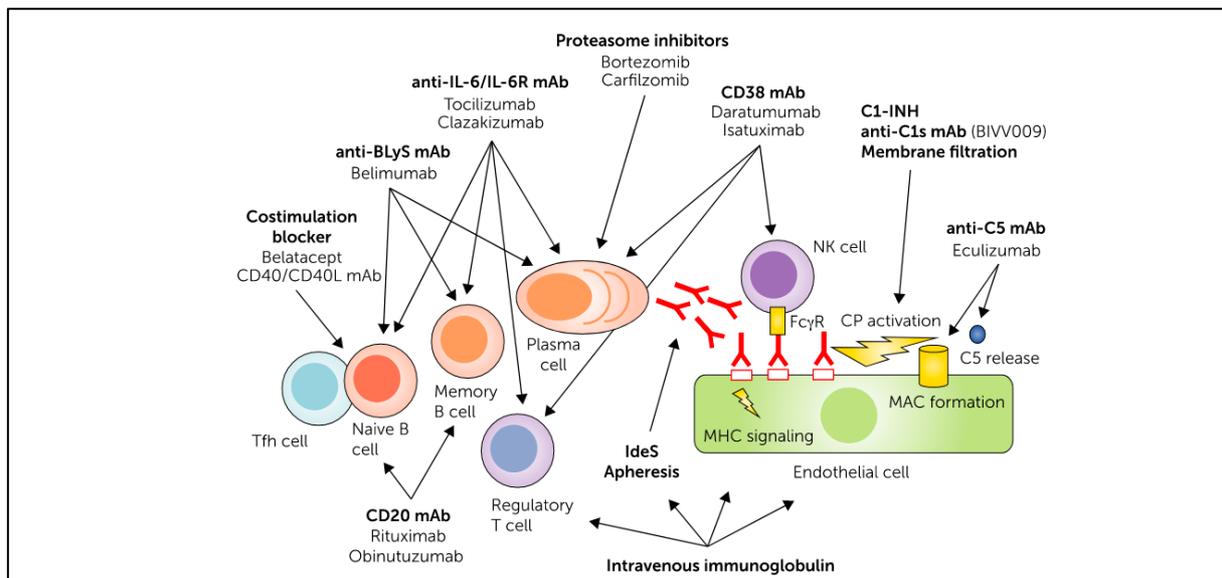


Abbildung 3: Pathogenese der ABMR und potenzielle Angriffspunkte (104)

IVIG dienen der Blockade des retikuloendothelialen Systems, sowie des Abbaus von Immunkomplexen. Sie dient der Aufrechterhaltung des IgG-Spiegels. Die Plasmapherese ist eine Technik, bei der extrakorporal zirkulierende Antikörper abgebaut werden können.

Des Weiteren wurde Rituximab, ein humanisierter anti-CD20-AK im Rahmen der „RITUXERAH“ Studie untersucht. Durch die Bindung von Rituximab an CD20 wird die Zelle über drei verschiedene Mechanismen zur Destruktion freigegeben. 1. Über die Antikörperabhängige Zytotoxizität, 2. Über CDC, was zur Aktivierung der Komplementkaskade führt, oder 3. Über eine zellvermittelte Apoptose über CD20-Cross-Linking (105). Ein Vorteil besteht in der schnellen

und anhaltenden Eliminierung zirkulierender B-Lymphozyten (die u.a. IL-6 produzieren (106)) im Rahmen einer akuten Transplantatabstoßung. Ein Nachteil stellt ein hohes Infektionsrisiko dar (107). In der genannten Studie konnte kein zusätzlicher Benefit gegenüber der alleinigen IVIG und Plasmapheresetherapie verzeichnet werden.

In der randomisierten kontrollierten Studie „BORTEJECT“ wurde der Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib untersucht. Den Endpunkt der Studie stellte die eGFR nach 2 Jahren dar. Der Einsatz von Bortezomib ergab keinen Benefit gegenüber Placebo (108). Ein Nachteil war zudem die gastrointestinale und hämatologische Toxizität. Ein weiteres größeres Feld stellen die monoklonalen Antikörper dar. Bspw. Tocilizumab, ein humanisierter monoklonaler anti-IL6R-AK. Interleukin-6(-Rezeptor) ist ein verbreiteter Angriffspunkt in der Therapie der rheumatoiden Arthritis. Durch die Hemmung der Differenzierung naiver B-Zellen zu Vorstufen und reifen Plasmazellen kommt es zu einer Reduktion der T-Zellinfiltration. Cabezas et al. untersuchten in ihrem Review sechs Studien, die insgesamt 117 PatientInnen inkludierten. Sie konnten eine Reduktion der DSA-Bildung, eine verminderte Inflammation und mikrovaskuläre Schädigungen in den entnommenen Biopsien, durch den Einsatz von Tocilizumab im Vergleich zur Standardtherapie, vernehmen (109). Auch hier besteht aufgrund der kleinen Studien eine geringe Aussagekraft.

In einer weiteren randomisierten kontrollierten Phase II-Studie wurde der anti-Bly monoklonale AK Belimumab untersucht (110). Bei dem zu kleinen Studienkollektiv konnte keine signifikante Reduktion der Anzahl naiver B-Zellen im peripheren Blut nach 24 Wochen, sowie keine signifikante Reduktion der B-Gedächtniszellen vernommen werden. Es kam jedoch zu einer reduzierten T-Zellproliferation. Im Rahmen der Therapie des Systemischen Lupus Erythematodes ist Belimumab ein gängiges Medikament.

Zudem wurden Komplementinhibitoren untersucht. Eculizumab, ein anti-C5-AK, konnte in einer kleinen Studie mit n=20 keinen Benefit gegenüber der Kontrollgruppe (Standardtherapie IVIG ± Plasmapherese) bzgl. dem Transplantatüberleben nach 1 Jahr erzielen (111).

Größere interventionelle Studien sind nötig, um bessere Aussagen über die Wirksamkeit der beschriebenen Substanzen tätigen zu können.

## 1.4 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen der unterschiedlichen Therapieschemata, im Sinne einer Standardimmunsuppression, einer Unterimmunsuppression und dem Einsatz eines anti-BAFF-Antikörpers, auf die immigrierenden Lymphozyten im Modell der experimentellen Nierentransplantation in der Ratte untersucht. Es wird zwischen einer frühen und einer späten chronischen Abstoßung, Tag 28 (d28) und Tag 56 (d56), unterschieden.

Dabei sind folgende Fragen zu bearbeiten:

1. Nehmen die unterschiedlichen Therapieschemata Einfluss auf die Anzahl der immigrierenden T-, B-, sowie Proliferierenden Zellen?
2. Nehmen die unterschiedlichen Therapieschemata Einfluss auf die proliferative Aktivität der immigrierenden T- und B-Lymphozyten?
3. Ist ein Zusammenhang zwischen der proliferativen Aktivität und den histopathologisch gesicherten Veränderungen (nach BANFF-Klassifikation) zu beobachten?
4. Ordnen sich die immigrierenden Zellen nach einem speziellen Schema (TLO-like) im Transplantat an?

## 2 Material und Methoden

In diesem Abschnitt wird das Vorgehen der Arbeit beschrieben. Zunächst erfolgt eine Übersicht über die verwendeten Geräte, Materialien und Methoden.

### 2.1 Verwendete Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
Schlittenmicrotom Slide 4003 E	pfm mediacal, Köln, Deutschland
Decloaking Chamber Plus	Biocare Medical, Concord, USA
Axio Observer.Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
AxioCam ERc 5s	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte

Software	Hersteller
HistoQuest 3.0	TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich
Axiovision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Microsoft Excel 365	Microsoft, USA

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Software

Kits	Hersteller
Avidin/Biotin Blocking Kit	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Permanent AP-Red Kit	Zytomed Systems inc, Berlin, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Kits

<b>Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Ag-Unmasking Solution	Linaris, H-3300, Dossenheim, Deutschland
Auqa-dest aus Milipore Anlage	Merck, Darmstadt, Deutschland
Avidin	Linaris, SP-200, Dossenheim, Deutschland
Biotin	Linaris, SP-200, Dossenheim, Deutschland
Superblock Solution	Pierce Technology, 37.515, Rockford, USA

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Lösungen

<b>Arzneimittel</b>	<b>Hersteller</b>
Cyclosporin A	Neoral, Novartis, Basel, Schweiz
monoklonaler anti-BAFF-Antikörper, Belimumab	GSK, Hamburg, Deutschland
ISO-Antikörper	Hamster IgG Isotyp; Leinco Technologies, Inc., MO

Tabelle 7: Übersicht verwendeter Arzneimittel

## 2.2 Projektbeschreibung

Am Universitätsklinikum Regensburg wurden in der Abteilung für Nephrologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Tobias Bergler Versuche im experimentellen Nierentransplantationsmodell der Ratte im Rahmen von Forschungsvorhaben zur Nierentransplantation durchgeführt. Diese erfolgten gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes und des National Institutes of Health (NIH). Hierbei fungierten männliche Brown Norway Ratten (BN) als Organspender und männliche Lewis Ratten (LEW) als Organempfänger. Die Versuchstiere stammten aus den Charles River Laboratorien in Sulzfeld, Deutschland, und wogen im Schnitt 200 - 250g. Im Zuge der Transplantation wurde zunächst den BN die linke Niere als Spenderniere explantiert. Diese linke Niere wurde jeweils mit kalter Kochsalzlösung gespült, und anschließend orthotop in LEW über End-zu-End-Anastomose der Gefäße und Ureteren implantiert. Bei der orthotopen Implantation wird das Spenderorgan an die anatomisch gleiche Lage des entnommenen Organs

eingesetzt. Die kalte und warme Ischämiezeit betrug circa 30 - 35 Minuten. Am Ende der Operation fand eine Nephrektomie der rechten Niere der LEW statt, so dass die Transplantatnieren mit Ende der Transplantation die gesamte Nierenleistung widerspiegelte. Es handelte sich um ein HLA-mismatched Modell. Das heißt, die entsprechenden Versuchstiere unterschieden sich genetisch in wesentlichen MHC-Merkmalen.

Anschließend wurden die Versuchstiere in Gruppen eingeteilt und unterschiedlich, wie in Tabelle 8 dargestellt, therapiert.

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden 39 Versuchstiere in 7 Gruppen à jeweils 4 - 6 Versuchstieren eingeteilt. Die Gruppen unterschieden sich in der Versuchsdauer nach erfolgter Transplantation, die entweder 28 Tage (d28) oder 56 Tage (d56) betrug.

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl Versuchstiere</b>	<b>Euthanasiezeitpunkt</b>	<b>CyA - Dosis</b>	<b>Antikörpergabe</b>	<b>Abkürzung</b>
1	6	d28	10 mg/kg KG	-	NR d28
2	6		5 mg/kg KG alt.	-	CR d28
3	6		5 mg/kg KG alt.	AK	CR + AK d28
4	4		5 mg/kg KG alt.	ISO-AK	CR + ISO-AK d28
5	6	d56	10 mg/kg KG	-	NR d56
6	6		5 mg/kg KG alt.	-	CR d56
7	5		5 mg/kg KG alt.	AK	CR + AK d56

Tabelle 8: Auflistung der betrachteten Gruppen

Zum besseren Verständnis des experimentellen Designs gibt Abbildung 4 einen Überblick.

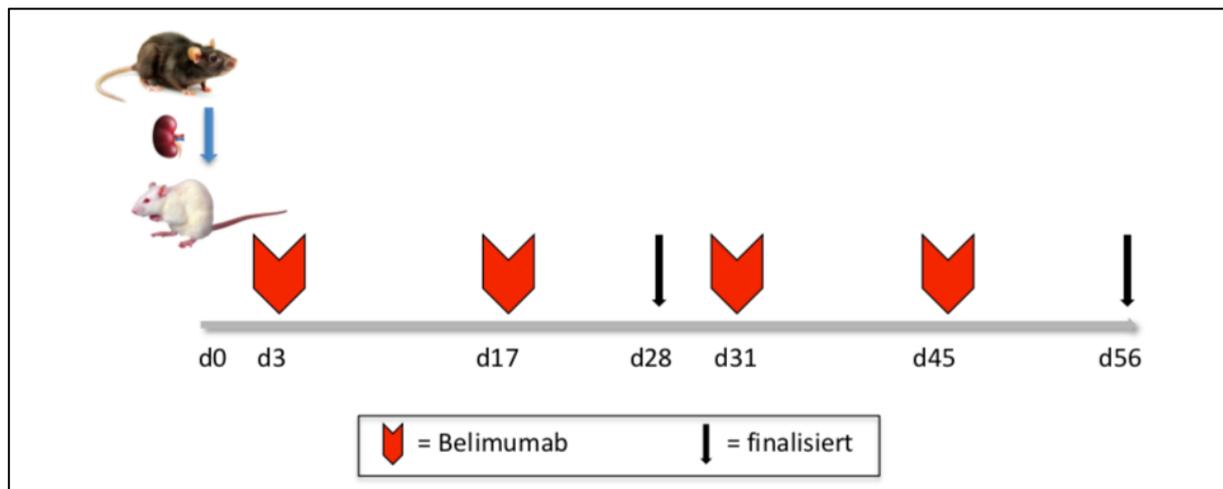


Abbildung 4: Modell des experimentellen Designs, Belimumab als anti-BAFF-AK. Abb. nach Steines et al. (112)

Bei den Versuchstieren der Gruppen 1 - 4 wurden die Nieren nach 28 Tagen (d28) entnommen und bei Gruppe 5 - 7 nach 56 Tagen (d56). In den Gruppen 1 und 5 erhielten die jeweils sechs Versuchstiere ab stattgefundener Transplantation täglich 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Cyclosporin A (CyA) (vgl. Tabelle 8). Cyclosporin A wurde als eines der aktuell standardmäßig verwendeten Immunsuppressiva nach Nierentransplantation ausgewählt. Diese Dosierung des Immunsuppressivums sollte die therapeutische Dosis darstellen, analog zu den Leitlinien, die für den klinischen Alltag gelten. Hierbei ging man davon aus, dass durch eine ausreichende T-Zell-Blockade keine Abstoßung des transplantierten Organs stattfindet (no rejection, NR). Daher galten die beiden Gruppen NR d28 und NR d56 als Referenzgruppen. In den Gruppen 2, 3, 4, 6 und 7 erhielten die Versuchstiere hingegen nur 5 mg/kg KG CyA alternierend. Das heißt, es erfolgte eine prolongierte Unterimmunsuppression durch die reduzierte CyA-Gabe. Die Versuchstiere erhielten hierfür während der ersten sechs Versuchstage täglich 5 mg/kg KG. Ab d7 wurde dies nur noch jeden zweiten Tag appliziert. Dies soll Ausdruck des „incomplianten Patientenkollektivs“ sein, welches seine immunsuppressive Therapie nicht regelmäßig einnimmt. Hierdurch wurde eine chronische Transplantatabstoßung (chronische Rejektion, CR) initiiert und die Bildung von DSA begünstigt. Gruppe 3 und 7 erhielten zusätzlich den monoklonalen Antikörper Belimumab (vgl. Tabelle 8). Dieser ist gegen den löslichen B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF) gerichtet. Im Folgenden werden diese zwei Gruppen als „CR+AK d28“ und

„CR+AK d56“ (vgl. Tabelle 8) bezeichnet. Der Anti-BAFF-AK wurde den Versuchstieren jeweils an d3, d17, d31 und d45 in die Peritonealhöhle appliziert (vgl. Abbildung 4). Die Versuchstiere der Gruppe 4 erhielten einen Iso-Antikörper (Iso-AK), um unspezifische Effekte der AK-Applikation auszuschließen. Dieser wurde an den gleichen Tagen wie der Anti-BAFF-AK ebenfalls in einer Dosierung von 10mg/kg KG in die Peritonealhöhle verabreicht. Die so behandelten Versuchstiere gehörten der Gruppe „CR+ISO-AK d28“ an. Bei einem Iso-AK handelt es sich um einen unspezifisch bindenden Antikörper. Dieser ist „gegen arteigene, jedoch körperfremde Antigene gerichtet (113).“ Am Ende des Experiments wurden jeweils die transplantierten Nieren entnommen und in Viertel geteilt. Diese wurden entweder in Paraffin fixiert oder mittels Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die histologische Einstufung der Transplantatabstoßung erfolgte anhand der Banff-Klassifikation (Vgl. 7.4 Banff-Klassifikation im Anhang) durch KollegInnen des Nephropathologischen Instituts des Uniklinikums Erlangen (Frau Prof. Dr. K. Amann).

## 2.3 Weiteres Vorgehen und Färbungen

Nach der Entnahme der Nieren der jeweiligen Versuchsgruppen schlossen sich folgende molekularbiologische Analytikschritte an.

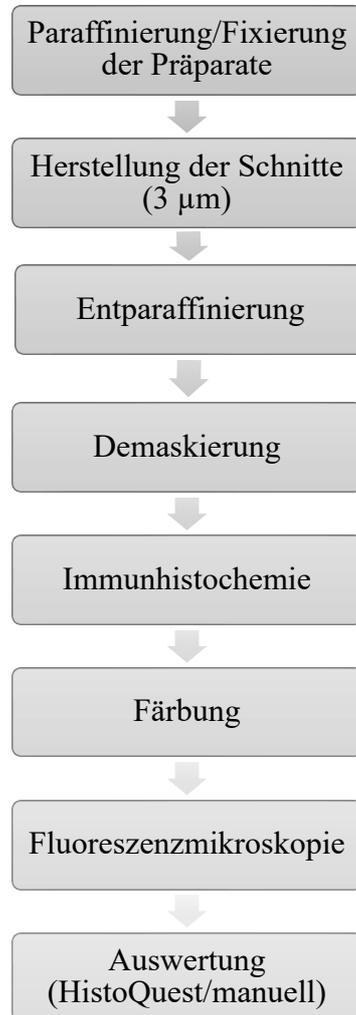


Abbildung 5: Übersicht über das weitere Vorgehen

### 2.3.1 Paraffinierung – Fixierung der Präparate und Herstellung der Paraffinschnitte

Die in Viertel geteilten Nierenpräparate wurden in Paraffin fixiert bzw. mittels Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Diese Paraffinblöcke wurden im Anschluss über Nacht bei -20°C gekühlt und härteten dann auf einer Kühlplatte bei -10°C aus. Mithilfe des Schlittenmicrotoms (vgl. Tabelle 3) wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt, welche in einem Wasserbad gestreckt, und anschließend auf Objektträger aufgebracht wurden. Als Nächstes erfolgte über Nacht die Austrocknung bei 37°C.

### 2.3.2 Entparaffinierung

Um die bestehenden 3 µm dicken Schnitte im nächsten Schritt anfärben zu können, wurden diese zunächst zweimal für 10 min in Xylol entparaffiniert. Danach wurden sie in absteigender Alkoholreihe (2 x 5 min 100% Ethanol, 2 x 5 min 96% Ethanol und 1 x 5 min 70% Ethanol) rehydriert und für 2 x 5 min in PBS-Puffer gewaschen.

### 2.3.3 Demaskierung

Im folgenden Schritt wurde eine Demaskierung der Antigenbindestellen durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte in die hergestellte Antigen-Retrieval-Lösung gestellt. Diese bestand aus 300 ml Aqua destillata und 3 ml Antigen-Unmasking-Lösung. Die sich in der Lösung befindenden Schnitte wurden nun für 30 min bei 121 °C in der „Decloaking Chamber Plus“ autoklaviert. Diese Methode wird als „Heat induced epitope retrieval-Technology“ bezeichnet. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie kurz in PBS geschwenkt und für 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Präparate auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift umkreist, um ein hydrophobes Milieu rund um das Gewebe zu generieren. So wurde das anschließende Auftropfen der jeweiligen Reagenzien vereinfacht. Von hieran wurden die Schnitte zur Vermeidung einer Austrocknung in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

### 2.3.4 Verwendete Antikörper und Färbungsmittel

Antikörper	Name	Verdünnung	Firma
Primärantikörper	rabbit anti-rat CD3	1:100	Abcam, 5690, Cambridge, UK
Sekundärantikörper	donkey anti-rabbit-Cy5	1:500	Dianova, 711-175-152, Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Antikörper, Zielmolekül CD3<sup>+</sup>Zellen

Antikörper	Name	Verdünnung	Firma
Primärantikörper	mouse anti-rat CD20	1:100	Santa Cruz, sc-393,894, Heidelberg, Germany
Sekundärantikörper	goat anti-mouse (IgM)- biotin	1:500	ThermoFisher, 31804
Tertiärantikörper	Strep Cy3		Dianova, 016-160-084, Hamburg, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Zielmolekül CD20<sup>+</sup>Zellen

Antikörper	Name	Firma
Proliferation	Anti-Ki67-FITC	ebioscience, 11-5698

Tabelle 11: Verwendete Antikörper, Zielmolekül Ki67<sup>+</sup>Zellen

Zielmolekül	Name	Verdünnung	Firma
Zellkerne	Hoechst 33,342	1:50,000	Molecular Probes H-1399, Waltham, USA

Tabelle 12: Färbung Zellkerne

### 2.3.5 Immunhistochemie

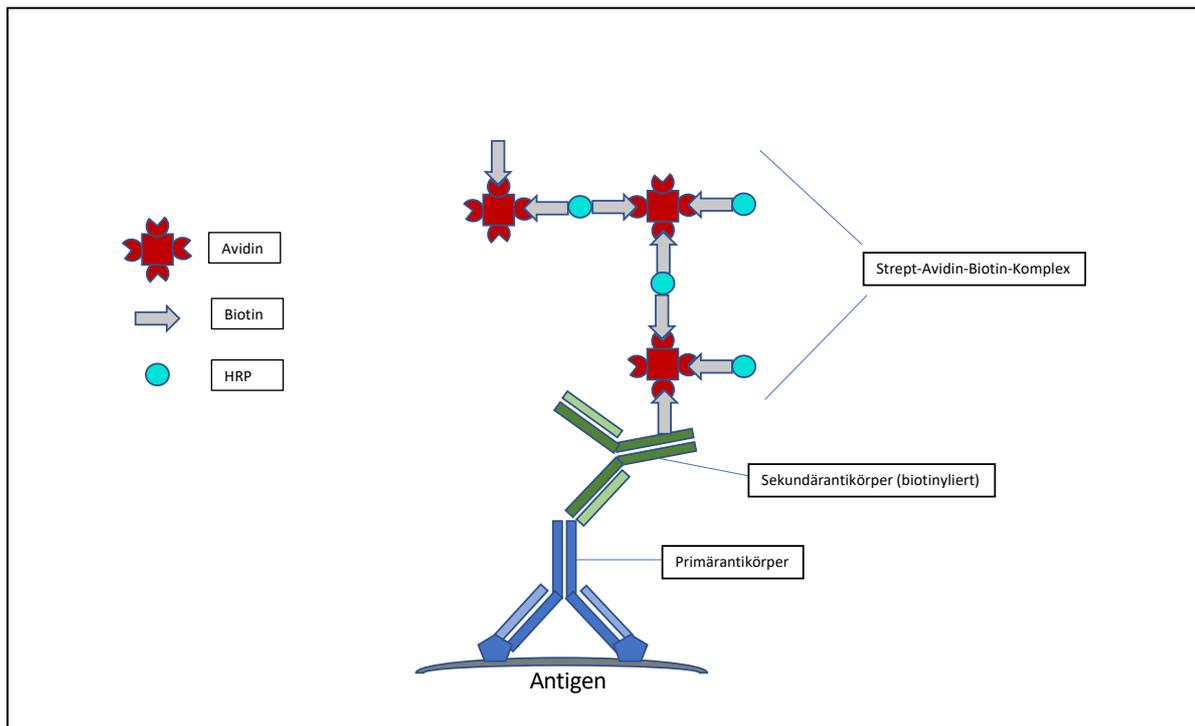


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde an den 3  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten durchgeführt. Bei der Immunhistochemie handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, mit Hilfe der Antigen-Antikörper-Bindung bestimmte Strukturen farblich darzustellen. Hierbei wird das gesuchte Antigen durch einen spezifischen primären Antikörper gebunden. Das Fc-Segment des primären Antikörpers stellt die Bindungsstelle des sekundären Antikörpers dar. Genauso bildet der Fc-Teil des sekundären Antikörpers die Bindungsstelle für den tertiären Antikörper, welcher farblich markiert ist. Diese dreistufige Methode ist die Methode der Wahl bei Proben mit einer kleinen Anzahl an Epitopen. Im vorliegenden Versuch bindet beispielsweise Streptavidin Cy3 an den biotinylierten Antikörper für  $\text{CD}20^+$  Zellen. Bei der Detektion  $\text{CD}3^+$  Zellen wurde die zweistufige Methode und bei der Detektion der  $\text{CD}20^+$  Zellen die dreistufige Methode angewandt. In diesem Versuch handelt es sich um eine indirekte Methode, welche durch den Einsatz mehrerer Antikörper gekennzeichnet, und für eine Signalverstärkung ursächlich ist (114). Um die Signalintensität dieser indirekten Methode weiter zu verstärken, wurde die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode genutzt, welche in Abbildung 6 verdeutlicht wird. Dabei bindet Biotin (Vitamin H) an den Fc-Teil des sekundären AKs. An das an den AK gebundene Biotin kann sich wiederum

Avidin anlagert. Avidin besitzt eine sehr hohe Affinität zu Biotin und verfügt über vier Bindungsstellen, an die je ein Biotin-Molekül binden kann. So wurde im vorliegenden Versuch im Falle von CD3<sup>+</sup> nachdem der Primärantikörper an das darzustellende Antigen (CD3<sup>+</sup>) gebunden hatte, der Sekundärantikörper aufgetragen. Im Anschluss wurde Avidin hinzugegeben, welches kovalent an das Biotinmolekül des Sekundärantikörpers bindet. Die restlichen drei freien Bindungsstellen des Avidins wurden mittels enzymbeladenen Biotins besetzt. Bei diesem Enzym handelte es sich um alkalische Phosphatase. Durch das im nächsten Schritt hinzugegebene Chromogen konnte nun eine enzymkatalysierte Farbreaktion ausgelöst werden. Die anschließende Gegenfärbung mit Hämalaun ermöglichte es, die umliegenden Strukturen, abgesehen von den darzustellenden Zellen, sichtbar zu machen. Hierunter fallen beispielsweise Tubuluszellen, Glomeruli und Gefäße.

In der praktischen Umsetzung wurden in den Versuchen auf die mit Antigen-Retrieval behandelten, sich in der feuchten Kammer befindenden Schnitte, Avidin aufgetragen und diese für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS geschwenkt und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Dann erfolgte das gleiche Prozedere mit Biotin. Zur allgemeinen Blockierung der Antigen-Bindestellen wurde Superblock auf die Schnitte in der feuchten Kammer gegeben und diese für 15 min inkubiert. Hier erfolgte im Anschluss keine Spülung. Die Lösung wurde lediglich abgekippt und direkt im Anschluss, wie im Folgenden unter 2.3.6 beschrieben, der Primärantikörper aufgetragen.

### **2.3.6 Färbung**

Färbung der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und der CD20<sup>+</sup>-B-Lymphozyten:

1. Primärantikörper (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10) in angegebener Verdünnung auftragen und bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer über Nacht inkubieren
2. Kurz in PBS schwenken, 3 x 5min mit PBS-Puffer waschen
3. Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10) in angegebener Verdünnung für 30min bei Raumtemperatur auf die Schnitte in der feuchten Kammer geben
4. Kurz in PBS schwenken, 2 x 5min mit PBS waschen
5. Tertiärantikörper (vgl. Tabelle 9 und Tabelle 10) für 1,5h bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubieren, hier auf Lichtschutz in der feuchten Kammer achten
6. Kurz in PBS schwenken, 2 x 5min mit PBS waschen

7. Gegenfärbung mit Hoechst 33342 Fluo Kernfarbstoff (vgl. Tabelle 12), mit PBS für 2 min inkubieren
8. Kurz in PBS schwenken, 1 x 5min mit PBS waschen
9. Eindecken mit FluoMountingMedium (DAKO, S3023)
10. Deckglas auflegen

#### Färbung der proliferierenden Zellen:

Bei dem Ki67-Antigen handelt es sich um einen Proliferationsmarker. Es wird nur von Zellen exprimiert, die im Begriff sind sich zu teilen und sich somit in der G1, S, G2 und Mitose-Phase des Zellzyklus befinden. In der Interphase befindet sich dieser im Zellkern. Während sich der Zellkern in der Mitose auflöst, lagert sich das Markerprotein (Ki67) an die Chromosomen. Über Antikörper kann dieser Prozess immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Ki67 Färbung unterscheidet sich im Vgl. zu der CD3 und CD20-Färbung in Punkt 5. Die Schnitte wurden hier mit Ki67-AK bei Raumtemperatur 1,5 h inkubiert. Da der Antikörper bereits fluoreszenzmarkiert ist, war hier kein zusätzlicher Sekundärantikörper notwendig. Anschließend wurde der Vorgang mit Punkt 6 (s.o.) analog fortgeführt.

## 2.4 Auswertung

### 2.4.1 Software-basierte Auswertung

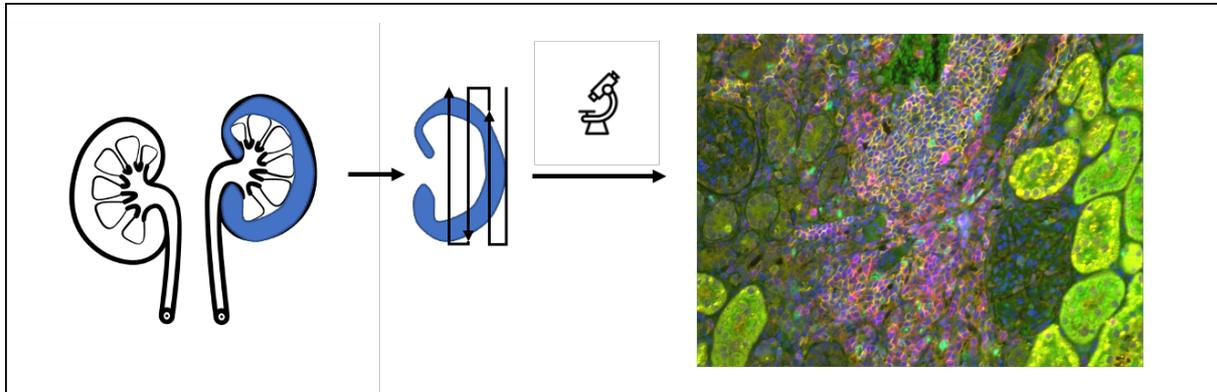


Abbildung 7: Schematischer Überblick der bearbeiteten Nierenrinde

Die nun präparierten Schnitte wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss observer Z1 der Firma Zeiss bei 20-facher Vergrößerung über die Mikroskopkamera AxioCam ERc5s betrachtet und mit Hilfe des Programmes Axio Vision digital erfasst. Dabei wurde die Nierenrinde jeweils mäanderförmig fotografiert (vgl. Abbildung 7). Pro Schnitt wurden die ersten 20 Gesichtsfelder festgehalten, die jeweils  $296\ \mu\text{m} \times 222\ \mu\text{m}$  maßen. Innerhalb dieser Gesichtsfelder wurde, falls vorhanden, auf Zellansammlungen gezoomt und diese in die Mitte des Gesichtsfeldes eingestellt. Waren über die 20 Gesichtsfelder hinaus noch mehr Zellansammlungen vorhanden, wurden diese ebenso erfasst. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Gesichtsfeldern pro Schnitt wurde später eine Auswertung anhand der Größe ( $\text{mm}^2$ ) und Anzahl der Gesichtsfelder durchgeführt. Um die Objektivität zu wahren, wurden in einem zweiten Datensatz von einer weiteren Person Zellansammlungen fotografiert. Hierbei erfolgte keine lückenlose Erfassung der Nierenrinde. Es wurden lediglich sog. Infiltrate erfasst. Diese sind im Rahmen der Auswertung unter „Zellen anhand der Infiltrate“ zu finden. Durch die unterschiedliche Anfärbung der jeweiligen Zellarten konnte, wie in Abbildung 8 beispielhaft dargestellt, zwischen den verschiedenen Zellarten unterschieden werden. Dabei wurden die Bilder zunächst mit dem Reflektor DAPI betrachtet, um herauszufinden, in welchem Gebiet sich Zellansammlungen befinden. Anschließend wurden die drei weiteren Reflektoren Cy5, DsRed und FITC darübergelegt, sodass ein Überblick über die verschiedenen immigrierten Zellarten gewonnen werden konnte. Intrarenale B-Zell- und T-Zell-Zonen wurden als dichte Ansammlung aus vorwiegend einer Zellart von einer Mindestgröße von 20 Zellen/ $0.004\ \text{mm}^2$  definiert.

Reflektoren	spezifische Zellfärbung	erscheinende Farbe
DAPI	Zellkernfärbung	blau
Cy5	CD3 <sup>+</sup>	pink
DsRed	CD20 <sup>+</sup>	gelb
FITC	Ki67 <sup>+</sup>	grün

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten fluoreszierenden Färbemittel und die dadurch sichtbar werdenden Zellbestandteile bzw. -arten

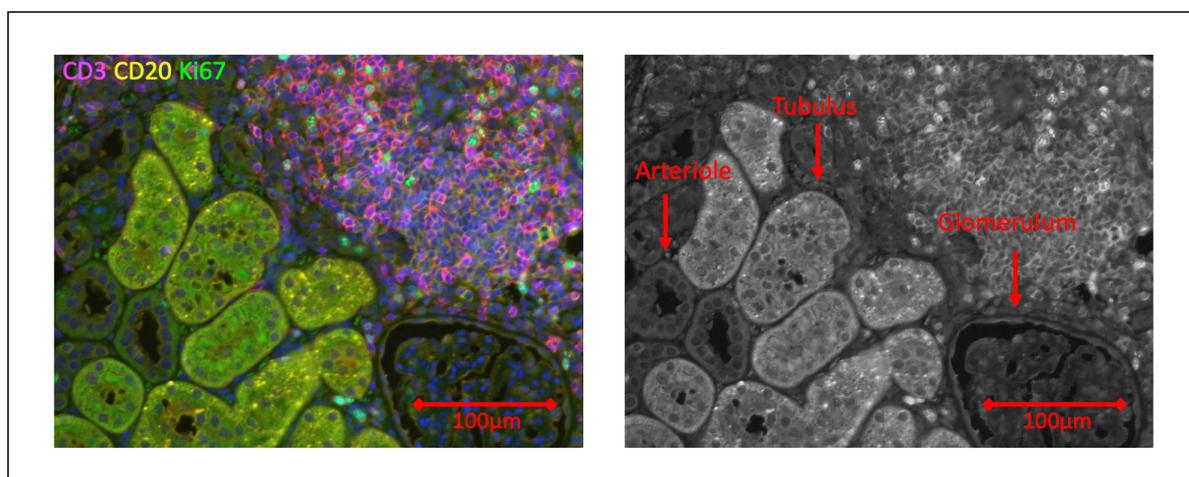


Abbildung 8: Beispiel zur Veranschaulichung der Färbungen, 20-facher Zoom

Anschließend wurden die Fotos mittels der Software Histoquest (TissueGnostics GmbH, Wien, Österreich) ausgewertet. Zu Beginn der Auswertung wurden hierfür Farbtöne für die einzelnen Marker CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> festgelegt. Um das umgebende Parenchym, jenseits der Zellsammlung innerhalb des Nierenrindengewebes, bestehend aus Tubuli, Arteriolen, Venolen und Glomeruli (vgl. Abbildung 8) von der Auswertung bzw. Zellzählung auszuschließen, wurden „Regions of Interest“ (ROIs) gebildet. Histoquest erkennt die Hämalaun-gefärbten Zellkerne innerhalb dieser ROIs durch einen benutzerdefinierten Blauton. In Kombination mit der als positiv eingestellten benutzerdefinierten Markerfärbung für die jeweiligen Zellarten konnte das Programm so die Anzahl der jeweiligen Zellen innerhalb der ROIs wiedergeben. Im Anschluss fand mithilfe von Histoquest eine Analyse und nachfolgend eine tabellarische Aufstellung der Ergebnisse, die die Anzahl der verschiedenen Zellen pro mm<sup>2</sup>, bezogen auf die Gesichtsfeldfläche, widerspiegelte, statt. Die Größe der Gesichtsfelder variierte zwischen 0,8 und

4,2 mm<sup>2</sup>, sodass im Anschluss eine Normierung der Zellzahlen pro mm<sup>2</sup> durchgeführt wurde. Analog wurden aus dem zweiten Datensatz die Zellen pro mm<sup>2</sup> bezogen auf die Infiltratflächen errechnet. Die Infiltratflächen variierten zwischen 0,01 – 1,03 mm<sup>2</sup>.

#### **2.4.2 Manuelle Auswertung**

Da es durch das Programm HistoQuest nicht möglich war, doppelt positiv angefärbte Zellen auszuzählen, wurden die Zellen, welche zugleich CD3<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> bzw. CD20<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> waren, manuell analysiert. Die Anzahl dieser proliferierenden T- und B-Lymphozyten wurde anhand der Infiltratbilder ausgezählt. Hierbei handelte es sich um die Bilder, die auch zur softwarebasierten Auswertung herangezogen wurden. In wenigen Fällen war keine eindeutige Zuordnung möglich.

#### **2.4.3 Statistische Auswertung**

Die statistischen Parameter der CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> bzw. Ki67<sup>+</sup> Zellen wurden anhand der von HistoQuest ermittelten Anzahl der jeweiligen Zellzahlen berechnet. Dabei wurden die positiven Zellen pro Gesichtsfeld erfasst. Für doppelt positive Zellen, sprich CD3<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> proliferierende T-Lymphozyten bzw. CD20<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> proliferierende B-Lymphozyten, wurden in einem zweiten Datensatz die ermittelten Werte der manuellen Auswertung herangezogen. Zur statistischen Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten wurden die Mittelwerte und Standardfehler mit dem Programm Microsoft Excel berechnet. Die Angabe der Daten erfolgt im Folgenden in MW ± SEM. Um die Signifikanz der miteinander verglichenen Gruppen zu beurteilen wurde ein studentischer T-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant gelten p-Werte < 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit).

#### **2.4.4 Histopathologische Betrachtung**

Durch Frau Prof. Dr. Kerstin Amann aus der Abteilung für Pathologie des Universitätsklinikums Erlangen erfolgte die histopathologische Betrachtung der angefertigten Schnitte. Durch sie konnte eine Einordnung anhand der BANFF-Klassifikation erfolgen.

### 3 Ergebnisse

In den folgenden Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchung der Nierentransplantate werden alle Angaben als Mittelwert der Anzahl der jeweils nachgewiesenen Zellen  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) getätigt. Wie bereits unter 2.4.3 beschrieben, gelten Werte für  $p < 0,05$  als statistisch signifikant. Eine weitere Abstufung erfolgt gemäß \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Im jeweils ersten Teil der Unterpunkte wird die Anzahl der jeweiligen Zellen anhand der Gesichtsfelder dargestellt. Im zweiten Teil wird die Anzahl der Zellen anhand der Infiltrate präsentiert. Hierbei werden lediglich Vergleiche mit signifikanten Unterschieden ausführlicher behandelt. Zum Ende der ersten drei Abschnitte findet sich je eine Tabelle mit einer Zusammenschau der Ergebnisse.

#### 3.1 T-Lymphozyten – CD3<sup>+</sup>

##### 3.1.1 T-Lymphozyten anhand der Gesichtsfelder

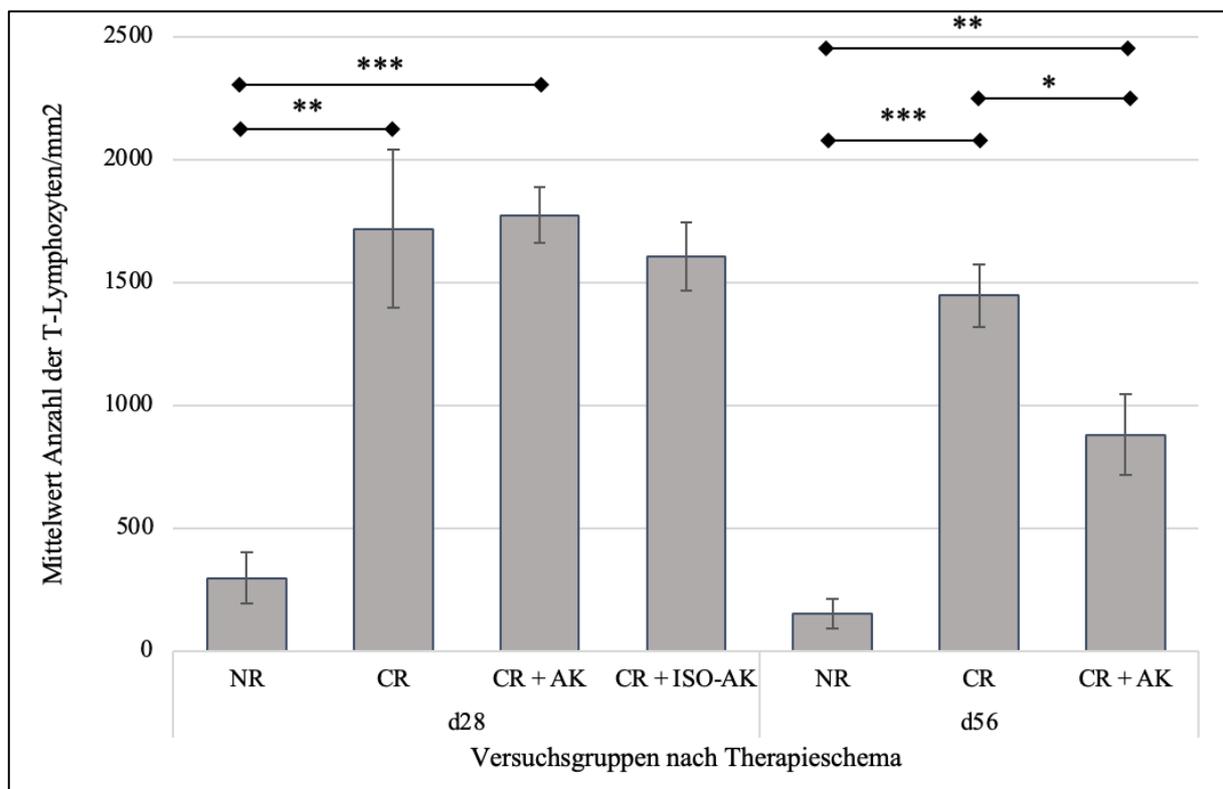


Abbildung 9: Anzahl CD3<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm<sup>2</sup>)

#### d28: NR vs. CR

Der Vergleich der angegebenen Untergruppen verdeutlicht, dass durch die alternierende Gabe von CyA deutlich höhere Zahlen der T-Lymphozyten zu beobachten waren ( $296,9 \pm 104,0$  vs.  $1718,5 \pm 322,2$ ). Dieser Unterschied war mit  $p=0,003$  statistisch signifikant.

#### d28: NR vs. CR + AK

Beim Vergleich der genannten Gruppen ergaben sich hoch signifikante Unterschiede ( $296,9 \pm 104,0$  vs.  $1774,3 \pm 114,5$ ;  $p=0,000005$ ).

#### d28: CR vs. CR + AK

Die Zugabe des Antikörpers im Vergleich zur alleinigen CyA-Gabe bot nur einen sehr geringen Unterschied der Anzahl der T-Lymphozyten, welcher keine statistische Relevanz aufwies ( $1718,5 \pm 104,0$  vs.  $1774,3 \pm 114,5$ ;  $p=0,884$ ).

#### d28: CR vs. CR + ISO-AK

Der Zusatz des nicht spezifisch bindenden ISO-AK hatte im Rahmen des Experiments keine signifikante Wirkung auf die T-Lymphozyten-Anzahl im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5mg CyA alternierend ( $1718,5 \pm 322,2$  vs.  $1606,9 \pm 138,5$ ;  $p=0,813$ ).

#### d56: NR vs. CR

An Tag 56 zeigte sich die Auswirkung der kontinuierlich fortgesetzten Vollimmunsuppression im Vergleich zur chronischen Unterimmunsuppression in deutlich ausgeprägter Art und Weise. Dies konnte durch die Werte  $152,7 \pm 60,2$  vs.  $1447,9 \pm 127,3$  verdeutlicht werden. Diese sind mit einem Wert für  $p<0,05$  signifikant ( $p=0,00002$ ).

#### d56: NR vs. CR + AK

Der Vergleich der T-Zellzahl von NR mit CR + AK an Tag 56 zeigte weiter einen signifikanten Unterschied ( $152,7 \pm 60,2$  vs.  $880,8 \pm 165,4$ ;  $p=0,007$ ).

d56: CR vs. CR+A

Dahingegen bestand an Tag 56 ein signifikanter Abfall der T-Lymphozyten Zahl bei der Betrachtung von CyA 5mg alternierend ohne vs. mit Antikörpergabe ( $1447,9 \pm 127,3$  vs.  $880,8 \pm 165,4$ ;  $p=0,03$ ).

In der folgenden Tabelle wird eine Übersicht über die einzelnen Gruppen, deren Mittelwerte und Standardfehler gegeben:

	Vergleiche anhand GF	MW $\pm$ SEM	p-Wert
d28	NR vs. CR	$296,9 \pm 104,0$ vs. $1718,5 \pm 322,2$	0,003**
	CR vs. CR + AK	$1718,5 \pm 322,2$ vs. $1774,3 \pm 114,5$	0,885
	CR vs. CR + ISO-AK	$1718,5 \pm 322,2$ vs. $1606,9 \pm 138,5$	0,813
	NR vs. CR + AK	$296,9 \pm 104,0$ vs. $1774,3 \pm 114,5$	0,000005***
d56	NR vs. CR	$152,7 \pm 60,2$ vs. $1447,9 \pm 127,3$	0,00002***
	CR vs. CR + AK	$1447,9 \pm 127,3$ vs. $880,8 \pm 165,4$	0,032*
	NR vs. CR + AK	$152,7 \pm 60,2$ vs. $880,8 \pm 165,4$	0,007**

Tabelle 14: Zusammenfassung CD3<sup>+</sup> Zellen. Vergleiche anhand der GF-Flächen

### 3.1.2 T-Lymphozyten anhand der Infiltrate

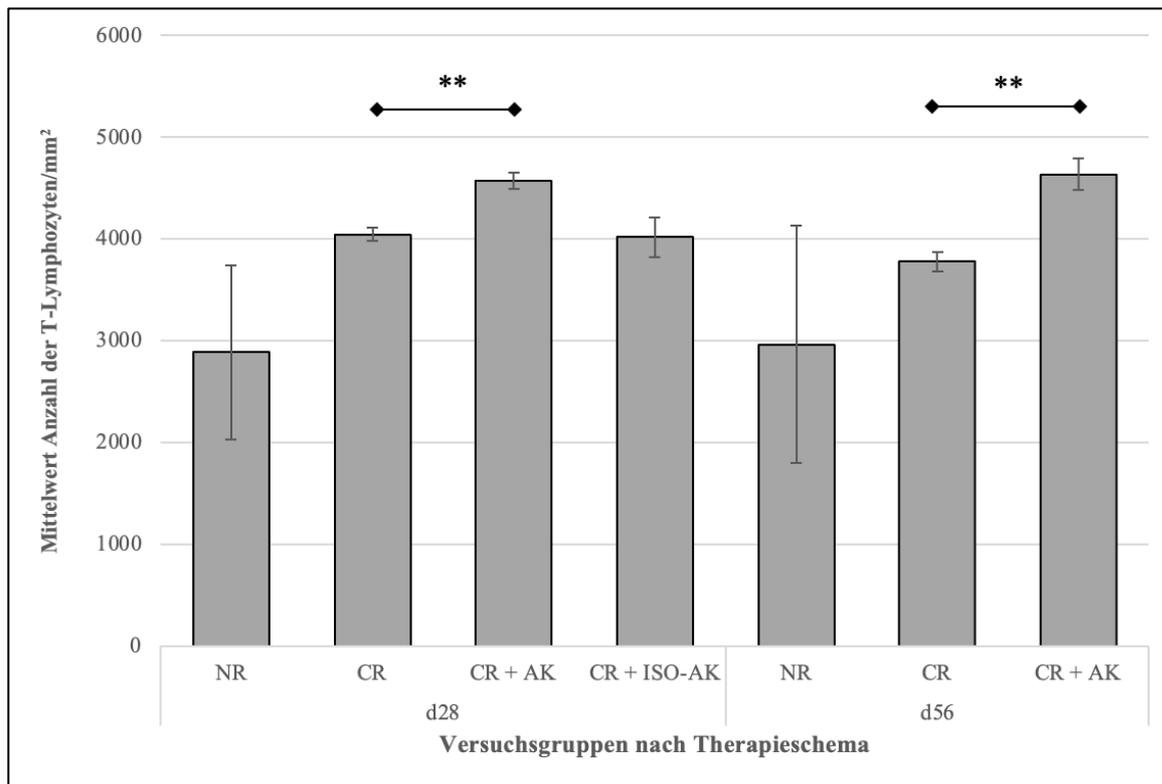


Abbildung 10: Anzahl CD3<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm<sup>2</sup>)

Anders als bei der Auswertung der immigrierenden T-Lymphozyten anhand der Gesichtsfelder zeigte lediglich der Vergleich der folgenden Gruppen einen signifikanten Unterschied.

#### d28: CR vs. CR + AK

Bei der Betrachtung der Infiltratflächen zeigte die Antikörpergabe an Tag 28 einen signifikanten Unterschied zur alleinigen Gabe von CyA, ( $4044,0 \pm 68,8$  vs.  $4572,6 \pm 79,6$ ;  $p=0,001$ ). Der Antikörper konnte hier folglich nicht herabregulierend auf die Anzahl der T-Lymphozyten einwirken.

#### d56: CR vs. CR + AK

Der gleiche Sachverhalt zeigte sich an d56. Es bestand ein statistischer Zusammenhang ( $3775,6 \pm 94,9$  vs.  $4634,6 \pm 154,7$ ;  $p=0,001$ ).

	Vergleiche anhand Infiltrate	MW ± SEM	p-Wert
d28	NR vs. CR	2884,7 ± 852,5 vs. 4044,0 ± 68,8	0,244
	CR vs. CR + AK	4044,0 ± 68,8 vs. 4572,6 ± 79,6	0,001**
	CR vs. CR + ISO-AK	4044,0 ± 68,8 vs. 4016,2 ± 192,9	0,892
	NR vs. CR + AK	2884,7 ± 852,5 vs. 4572,6 ± 79,6	0,102
d56	NR vs. CR	2963,7 ± 1166,4 vs. 3775,6 ± 94,9	0,509
	CR vs. CR + AK	3775,6 ± 94,9 vs. 4634,6 ± 154,7	0,001**
	NR vs. CR + AK	2963,7 ± 1166,4 vs. 4634,6 ± 154,7	0,194

Tabelle 15: Zusammenfassung CD3<sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand von Infiltraten

## 3.2 B-Lymphozyten - CD20<sup>+</sup>

### 3.2.1 B-Lymphozyten anhand der Gesichtsfelder

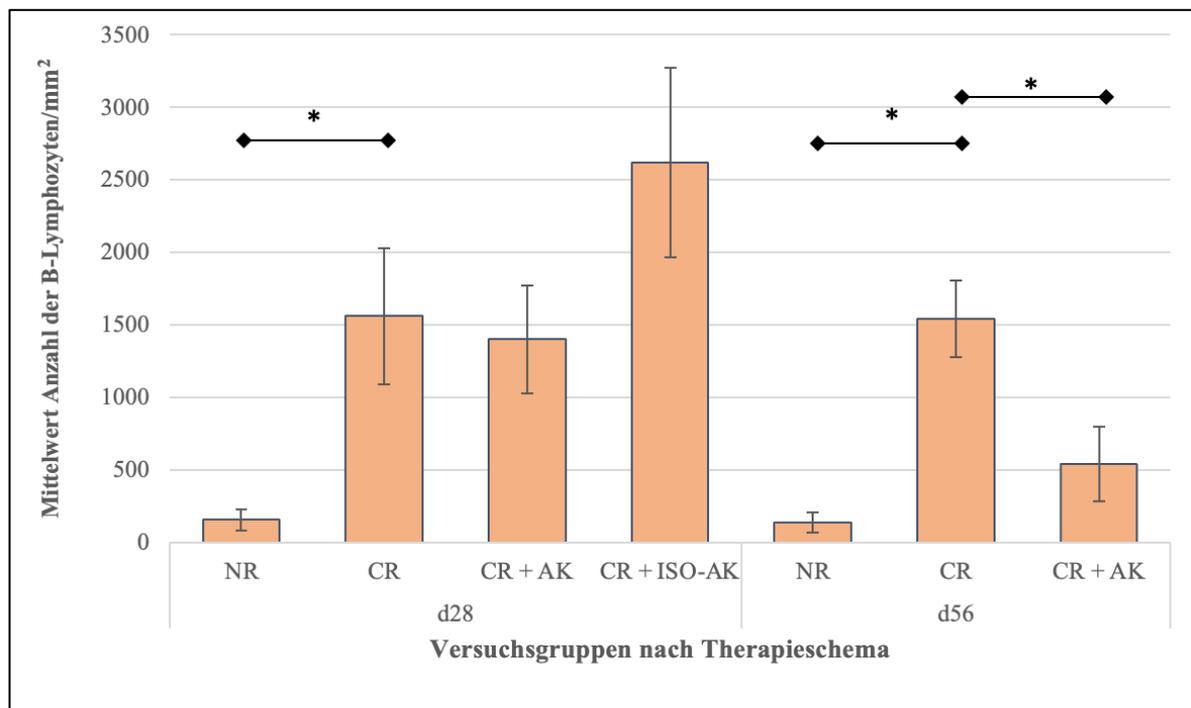


Abbildung 11: Anzahl CD20<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm<sup>2</sup>)

#### d28: NR vs. CR

Beim Vergleich der Anzahl der immigrierenden B-Lymphozyten an Tag 28 einerseits unter der Therapie mit 10mg CyA (NR) und andererseits unter der alternierenden Gabe von CyA (CR), ergaben sich folgende Werte:  $156,3 \pm 72,1$  vs.  $1558,3 \pm 471,6$ . Dieser Unterschied war mit einem Wert von  $p=0,022$  signifikant.

#### d28: NR vs. CR + AK

Die Antikörpergabe zeigte an Tag 28 keinen reduzierenden Einfluss auf die Anzahl der immigrierten B-Lymphozyten im Vergleich zur Standardimmunsuppression. Beim Vergleich der genannten Gruppen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $156,3 \pm 72,1$  vs.  $1398,8 \pm 374,8$ ;  $p=0,014$ ).

#### d28: CR vs. CR + AK

An Tag 28 wurde keine ausgeprägte Wirkung des Antikörpers gegenüber der alleinigen alternierenden CyA-Gabe beobachtet ( $1558,3 \pm 471,6$  vs.  $1398,8 \pm 374,8$ ;  $p=0,813$ ).

#### d28: CR vs. CR + ISO-AK

Der Zusatz des nicht spezifisch bindenden ISO-AKs zeigte keine signifikante Wirkung auf die B-Lymphozyten-Anzahl im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5mg CyA alternierend ( $1558,3 \pm 471,6$  vs.  $2619,5 \pm 651,6$ ;  $p=0,230$ ).

#### d56: NR vs. CR

Die B-Zellzahlen der beschriebenen Untergruppen standen an d56 in einem statistischen Zusammenhang ( $135,1 \pm 70,2$  vs.  $1540,2 \pm 262,8$ ;  $p=0,001$ ). In der Gruppe NR d56 fiel eine deutlich niedrigere B-Zellzahl im Vergleich mit CR d56 auf.

#### d56: NR vs. CR + AK

An Tag 56 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen NR und CR + AK ( $135,1 \pm 70,2$  vs.  $541,0 \pm 255,9$ ;  $p=0,233$ ).

d56: CR vs. CR + AK

Dahingegen zeigte sich an d56 ein signifikanter Unterschied der B-Lymphozytenzahl beim Vergleich von CR + CR+AK ( $1540,2 \pm 262,8$  vs.  $541,0 \pm 255,9$ ;  $p=0,032$ ). Durch die zusätzlichen Verwendung des anti-BAFF-AKs konnte eine signifikant niedrigere Zahl von CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten ermittelt werden.

	Vergleiche anhand GF	MW $\pm$ SEM	p-Wert
d28	NR vs. CR	$156,3 \pm 72,1$ vs. $1558,3 \pm 471,6$	0,022*
	CR vs. CR + AK	$1558,3 \pm 471,6$ vs. $1398,8 \pm 374,8$	0,813
	CR vs. CR + ISO-AK	$1558,3 \pm 471,6$ vs. $2619,5 \pm 651,6$	0,230
	NR vs. CR + AK	$156,3 \pm 72,1$ vs. $1398,8 \pm 374,8$	0,230
d56	NR vs. CR	$135,1 \pm 70,2$ vs. $1540,2 \pm 262,8$	0,001*
	CR vs. CR + AK	$1540,2 \pm 262,8$ vs. $541,0 \pm 255,9$	0,032*
	NR vs. CR + AK	$135,1 \pm 70,2$ vs. $541,0 \pm 255,9$	0,233

Tabelle 16: Zusammenfassung CD20<sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand der GF-Flächen

### 3.2.2 B-Lymphozyten anhand der Infiltrate

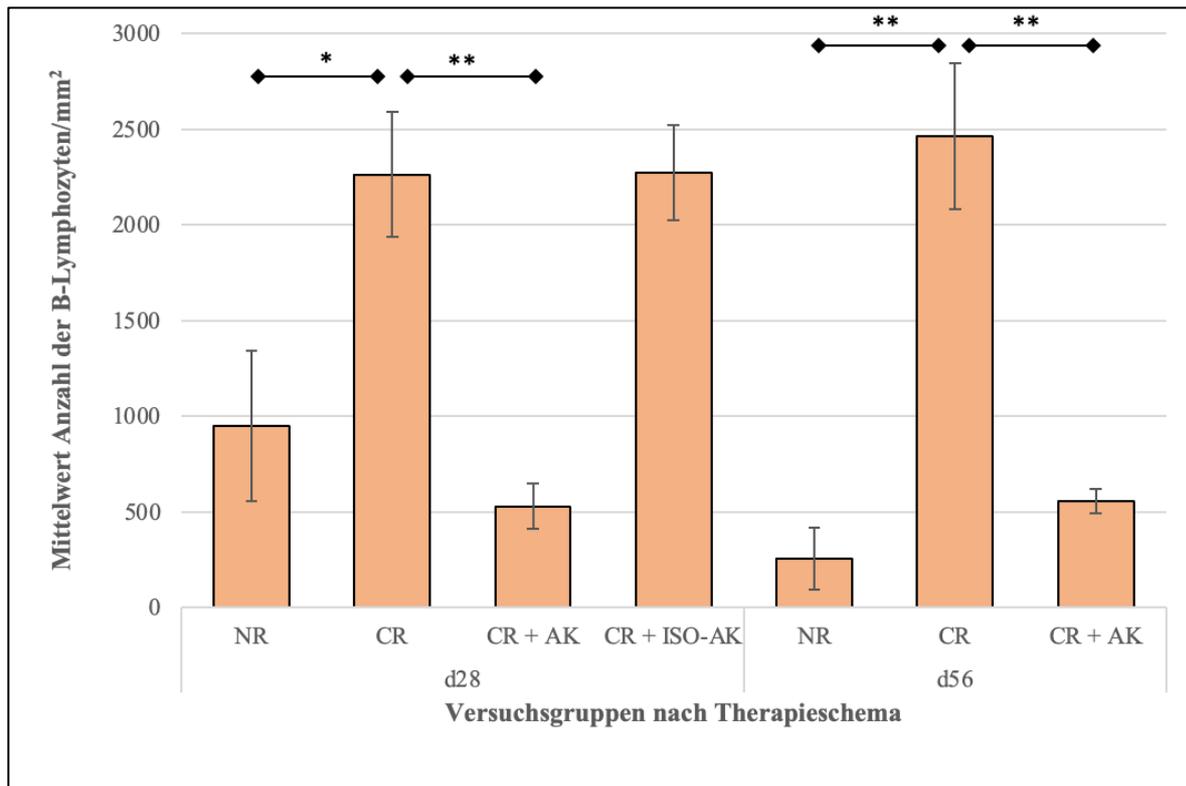


Abbildung 12: Anzahl CD20<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm<sup>2</sup>)

#### d28: NR vs. CR

Auch anhand der Infiltratflächen konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen den Gruppen NR und CR an Tag 28 beobachtet werden ( $949,1 \pm 393,0$  vs.  $2264,3 \pm 327,1$ ;  $p=0,04$ ).

#### d28: CR vs. CR + AK

Der Einsatz des anti-BAFF-Antikörpers bewirkte an Tag 28 einen signifikanten Unterschied der B-Zellzahl im Vergleich zur alleinigen CyA-Gabe ( $2264,3 \pm 327,1$  vs.  $530,3 \pm 117,5$ ;  $p=0,001$ ).

#### d56: NR vs. CR

Noch ausgeprägter zeigte sich die Signifikanz der B-Lymphozytenanzahl an Tag 56 bei der Betrachtung von NR vs. CR ( $255,1 \pm 161,4$  vs.  $2464,6 \pm 383,5$ ;  $p=0,001$ ).

d56: CR vs. CR + AK

Ebenso wie an Tag 28 verhielt sich die B-Zellzahl der betrachteten Gruppen an Tag 56. Es lag eine statistische Signifikanz vor ( $2464,6 \pm 383,5$  vs.  $557,7 \pm 62,8$ ;  $p=0,001$ ).

	<b>Vergleiche anhand Infiltrate</b>	<b>MW <math>\pm</math> SEM</b>	<b>p-Wert</b>
d28	NR vs. CR	$949,1 \pm 393,0$ vs. $2264,3 \pm 327,1$	0,040*
	CR vs. CR + AK	$2264,3 \pm 327,1$ vs. $530,3 \pm 117,5$	0,001**
	CR vs. CR + ISO-AK	$2264,3 \pm 327,1$ vs. $2274,2 \pm 246,6$	0,984
	NR vs. CR + AK	$949,1 \pm 393,0$ vs. $530,3 \pm 117,5$	0,373
d56	NR vs. CR	$255,1 \pm 161,4$ vs. $2464,6 \pm 383,5$	0,001**
	CR vs. CR + AK	$2464,6 \pm 383,5$ vs. $557,7 \pm 62,8$	0,001**
	NR vs. CR + AK	$255,1 \pm 161,4$ vs. $557,7 \pm 62,8$	0,126

Tabelle 17: Zusammenfassung CD20<sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand von Infiltraten

### 3.3 Proliferierende Zellen – Ki67<sup>+</sup>

#### 3.3.1 Proliferierende Zellen anhand der Gesichtsfelder

In Abbildung 13 ist die jeweilige Anzahl an Ki67<sup>+</sup> proliferierenden Zellen der Gruppen dargestellt. Es wird nicht zwischen proliferierenden B- und T-Lymphozyten differenziert. Diese Auswertung ist unter 3.3.3 zu finden.

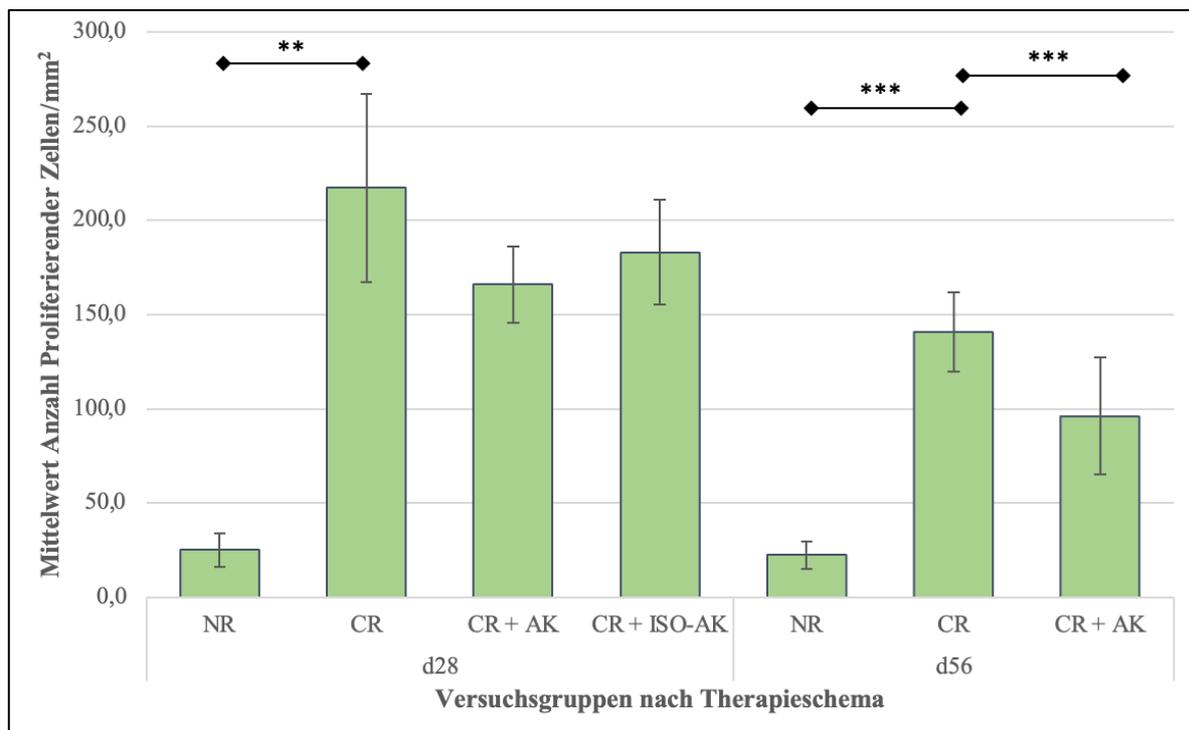


Abbildung 13: Anzahl Ki67<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm<sup>2</sup>)

#### d28: NR vs. CR

Der Vergleich der Anzahl Ki67<sup>+</sup>-Zellen unter standardmäßiger Immunsuppression mit der alternierenden Gabe einer geringeren Dosis Cyclosporin A an Tag 28 ergab einen signifikanten Unterschied von  $p=0,006$  ( $25,1 \pm 8,8$  vs.  $217,4 \pm 49,9$ ).

#### d28: NR vs. CR + AK

Bei den angegebenen Gruppen wird ersichtlich, dass durch die Vollimmunsuppression in NR signifikant weniger proliferierende Zellen im Vergleich zur alternierenden Gabe von 5mg CyA + Antikörpergabe Belimumab gezählt wurden ( $25,1 \pm 8,8$  vs.  $166,1 \pm 20,2$ ;  $p=0,0001$ ).

#### d28: CR vs. CR + AK

Durch den Einsatz des Anti-BAFF-Antikörpers wurde an Tag 28 eine geringere Anzahl an proliferierenden Zellen im Vergleich zur Therapie ohne AK ermittelt ( $217,4 \pm 49,9$  vs.  $166,1 \pm 20,2$ ). Mit  $p=0,405$  bestand keine statistische Relevanz.

#### d28: CR vs. CR + ISO-AK

Ebenso wurde durch den Einsatz des ISO-AK an d28 keine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen gemessen ( $217,4 \pm 49,9$  vs.  $183,0 \pm 27,8$ ;  $p=0,650$ ).

#### d56: NR vs. CR

Die Anzahl der proliferierenden Zellen war in der Gruppe CR d56 im Vergleich zu NR d56 sechsmal so hoch. Dies zeigte eine statistische Signifikanz ( $22,4 \pm 7,5$  vs.  $141,0 \pm 21,0$ ;  $p=0,001$ ).

#### d56: NR vs. CR + AK

An Tag 56 konnte analog zu Tag 28 beobachtet werden, dass die Vollimmunsuppression mit einer geringeren Anzahl an proliferierenden Zellen im Vergleich zur alternierenden Gabe + Antikörper einherging. Eine statistische Signifikanz war hier jedoch nicht gegeben ( $22,4 \pm 7,5$  vs.  $96,2 \pm 31,2$ ;  $p=0,087$ ).

#### d56: CR vs. CR + AK

Wurde die Gruppe CR an Tag 56 mit der zusätzlichen Gabe des Antikörpers in CR + AK verglichen, ergaben sich folgende Werte, die keinen statistischen Zusammenhang zeigten:  $141,0 \pm 21,0$  vs.  $96,2 \pm 31,2$ ;  $p=0,302$ .

	Vergleiche anhand GF	MW ± SEM	p-Wert
d28	NR vs. CR	25,1 ± 8,8 vs. 217,4 ± 49,9	0,006**
	CR vs. CR + AK	217,4 ± 49,9 vs. 166,1 ± 20,2	0,405
	CR vs. CR + ISO-AK	217,4 ± 49,9 vs. 183,0 ± 27,8	0,302
	NR vs. CR + AK	25,1 ± 8,8 vs. 166,1 ± 20,2	0,087
d56	NR vs. CR	22,4 ± 7,5 vs. 141,0 ± 21,0	0,001***
	CR vs. CR + AK	141,0 ± 21,0 vs. 96,2 ± 31,2	0,0001***
	NR vs. CR + AK	22,4 ± 7,5 vs. 96,2 ± 31,2	0,650

Tabelle 18: Zusammenfassung Ki67<sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand der GF-Flächen

### 3.3.2 Proliferierende Zellen Ki67<sup>+</sup> anhand der Infiltrate

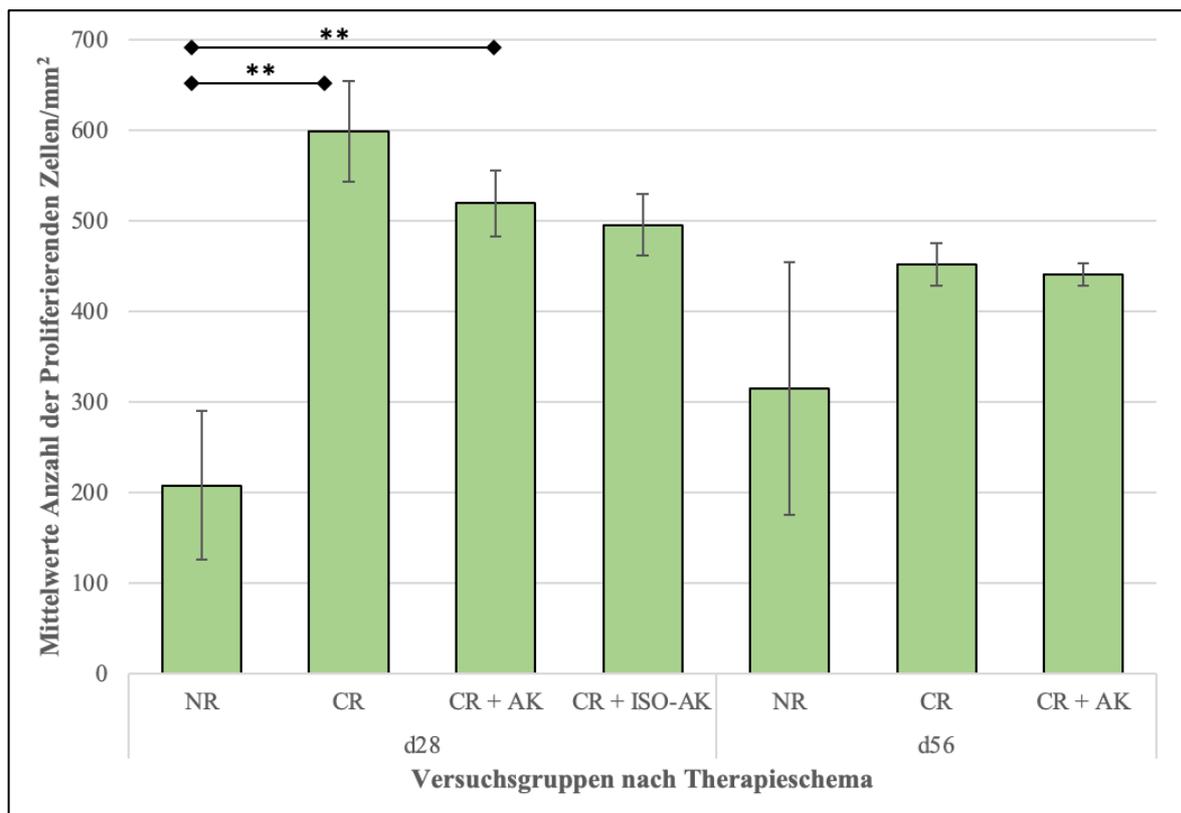


Abbildung 14: Anzahl Ki67<sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm<sup>2</sup>)

d28: NR vs. CR

Beim Vergleich der angegebenen Gruppen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzahl mit  $p=0,004$ ; ( $207,5 \pm 82,1$  vs.  $599,0 \pm 55,5$ ).

d28: NR vs. CR + AK

Ähnlich war es beim Vergleich der Gruppe der Vollimmunsupprimierten und derer, die eine alternierende Immunsuppression plus anti-BAFF-AK erhalten hatten ( $207,5 \pm 82,1$  vs.  $519,6 \pm 36,6$ ;  $p=0,009$ ).

	Vergleiche anhand Infiltrate	MW $\pm$ SEM	p-Wert
d28	NR vs. CR	$207,5 \pm 82,1$ vs. $599,0 \pm 55,5$	0,004**
	CR vs. CR + AK	$599,0 \pm 55,5$ vs. $519,6 \pm 36,6$	0,301
	CR vs. CR + ISO-AK	$599,0 \pm 55,5$ vs. $495,7 \pm 34,2$	0,244
	NR vs. CR + AK	$207,5 \pm 82,1$ vs. $519,6 \pm 36,6$	0,009**
d56	NR vs. CR	$315,1 \pm 139,6$ vs. $451,9 \pm 23,0$	0,365
	CR vs. CR + AK	$451,9 \pm 23,0$ vs. $440,7 \pm 12,6$	0,706
	NR vs. CR + AK	$315,1 \pm 139,6$ vs. $440,7 \pm 12,6$	0,398

Tabelle 19: Zusammenfassung Ki67<sup>+</sup> Zellen, Vergleich anhand von Infiltraten

### 3.3.3 Proliferierende T- und B-Lymphozyten

Durch eine manuelle Auszählung der proliferierenden Ki67<sup>+</sup>Zellen konnten diese anhand ihrer lymphozytären Orientierung weiter differenziert werden. Die nähere Ausführung dazu findet sich unter 4.2 in der Diskussion.

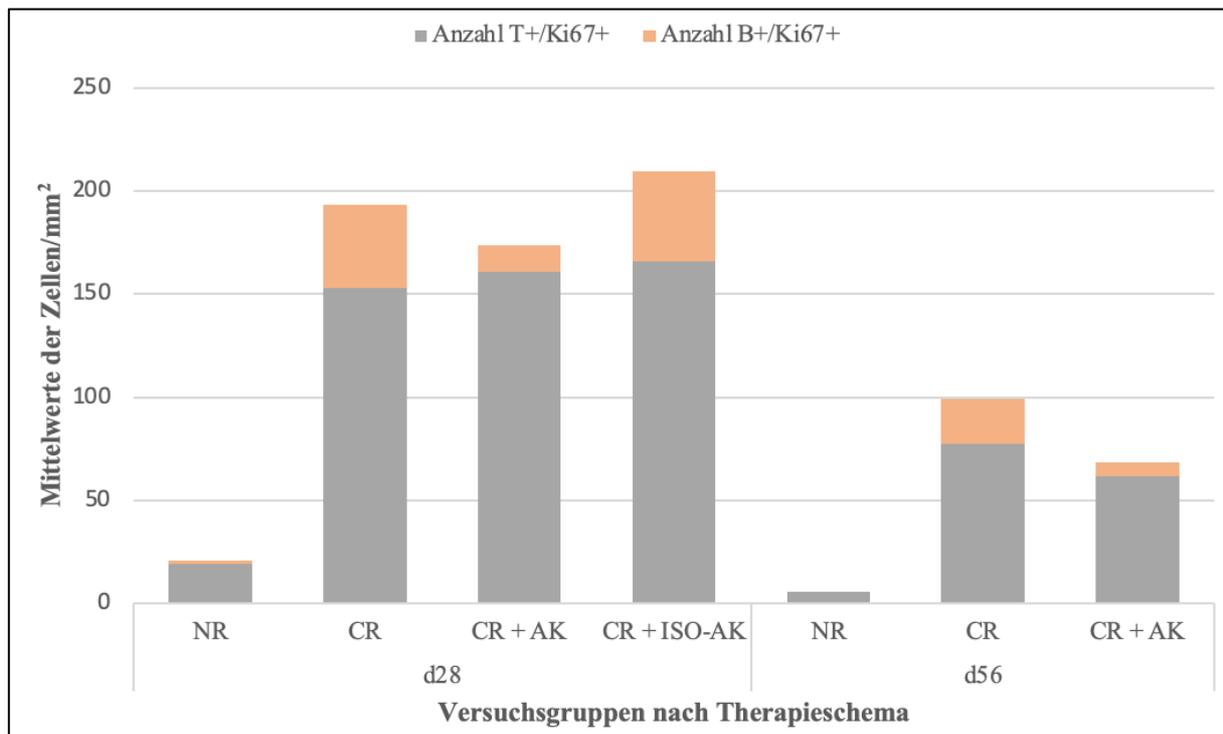


Abbildung 15: Anzahl proliferierender T- und B-Lymphozyten

In Abbildung 15 ist die Anzahl proliferierender T- und B-Lymphozyten schematisch dargestellt. Es wird deutlich, dass der Großteil der proliferierenden Zellen durch Ki67<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten (grau) repräsentiert wird. Daraus ist zu schließen, dass in unserem Projekt eine vermehrte T-Lymphozytenproliferation im Vergleich zur B-Lymphozytenproliferation beobachtet werden konnte. An d28 war unter Standardimmunsuppression, in Gruppe NR d28 dargestellt, fast keine, und an d56 unter den besagten Umständen keine B-Zell-Proliferation nachzuweisen. Auf Grundlage der erhobenen Daten konnte der unter 3.3.4 ausgeführte Proliferationsindex berechnet werden.

### 3.3.4 Proliferationsindex

Der Proliferationsindex wird wie folgt berechnet:

$$\text{Proliferationsindex T-Lymphozyten (PiT)} = \frac{\text{CD3}^+ \text{ Ki67}^+}{\text{CD3}^+}$$

$$\text{Proliferationsindex B-Lymphozyten (PiB)} = \frac{\text{CD20}^+ \text{ Ki67}^+}{\text{CD20}^+}$$

	Gruppe	PiT (%)	PiB (%)
d28	NR	4,2	0,5
	CR	6,3	3,0
	CR + AK	5,8	4,7
	CR + ISO-AK	6,5	2,7
d56	NR	8,5	0,0
	CR	5,2	2,2
	CR + AK	6,0	3,0

Tabelle 20: Proliferationsindex anhand von Infiltraten, Darstellung der Mittelwerte

Der Proliferationsindex wurde analysiert, um zu verdeutlichen, inwiefern die verschiedenen Therapieprotokolle einen Einfluss auf die Zellproliferation der CD3<sup>+</sup>-T- und CD20<sup>+</sup>-B-Lymphozyten nehmen. So berechnet sich der Proliferationsindex der T-Lymphozyten bspw. nach der oben beschriebenen Formel mittels der Anzahl der doppelt positiven CD3<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> Zellen gemessen an den ausgezählten CD3<sup>+</sup> Zellen innerhalb der zuvor beschriebenen Infiltrate. Da das Programm Histoquest es nicht ermöglichte doppelt positive Zellen auszuzählen, erfolgte dies manuell.

Auf den ersten Blick fiel auf, dass die T-Lymphozyten in allen Gruppen einen höheren prozentualen Anteil proliferativ aktiver Zellen im Vergleich zu den B-Lymphozyten aufwiesen.

### PiT:

Betrachtet man die Proliferation der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen an d28, so wird deutlich, dass in der Gruppe NR weniger proliferative T-Lymphozyten als in den verbleibenden drei Gruppen (CR, CR + AK, CR + ISO-AK) zu finden sind (4,2 % vs. 6,3% (CR); 5,8% (CR + AK); 6,5% (CR + ISO-AK)). Eine statistische Signifikanz mit  $p < 0,05$  zeigte sich sowohl beim Vergleich von NR mit CR als auch mit CR + AK. Durch den Einsatz des anti-BAFF-AKs (CR + AK) wies im Vergleich zur alleinigen alternierenden 5mg CyA-Gabe (CR) ein geringerer Anteil der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen eine proliferative Aktivität auf (6,3% (CR) vs. 5,8% (CR + AK)). Dieser Unterschied war jedoch nicht von statistischer Relevanz ( $p = 0,64$ ). An Tag 56 war in der NR-Gruppe im Vergleich zur CR- und CR + AK-Gruppe ein höherer Anteil an proliferierenden T-Lymphozyten zu sehen (8,5% (NR) vs. 5,2% (CR); 6,0% (CR + AK)). Hierbei bestand jedoch ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Durch den Einsatz des anti-BAFF-AKs konnte an d56, anders als an d28, kein Effekt auf den Anteil der proliferierenden T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der CD3<sup>+</sup>Zellen erfasst werden (5,2% (CR) vs. 6,0% (CR + AK);  $p = 0,33$ ).

### PiB:

Der prozentuale Anteil der proliferierenden B-Lymphozyten an den B-Zellen war in allen betrachteten Gruppen an d28 höher als an d56. An Tag 28 war durch die Standardimmunsuppression in NR ein Anteil der proliferierenden B-Lymphozyten an den ausgezählten B-Zellen der Infiltrate von 0,5% festzustellen. Da an Tag 56 nach dem Therapieschema NR keine proliferierenden B-Lymphozyten vorlagen, war klar, dass der Anteil der proliferierenden B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten nach dem Therapieschema CR und CR + AK im Vergleich zu NR signifikant höher ist (2,2% & 3,0% vs. 0,0%;  $p$  (CR vs. NR)  $< 0,001$ ;  $p$  (CR + AK vs. NR) = 0,02). Der Einsatz des Anti-BAFF-AKs zeigte im Vergleich zur alleinigen alternierenden CyA-Gabe in der Dosierung 5mg/kg KG keinen modulierenden Effekt auf die Proliferation der B-Lymphozyten (4,7% vs. 3,0%). Es bestand mit  $p = 0,33$  kein statistischer Zusammenhang zwischen diesen Parametern.

### **3.3.5 Proliferation und BANFF-Klassifikation**

Geht eine höhere Anzahl an proliferierenden Zellen, sowie eine höhere Proliferationsrate der T- und B-Lymphozyten mit einer entsprechenden Kategorie der BANFF-Klassifikation einher?

Im folgenden Schritt konnte ein Abgleich der Anzahl proliferativ aktiver Zellen, sowie dem Proliferationsindex mit der histopathologisch festgestellten Abstoßungskategorie anhand der BANFF-Klassifikation stattfinden. Hierfür wurden durch Frau Prof. Kerstin Amann am Universitätsklinikum Erlangen in Abteilung für Pathologie die besagten Schnitte in die BANFF-Klassifikation eingeteilt.

Es wurde ersichtlich, dass in den Gruppen NR d28 und d56, in denen die Versuchstiere die Standardimmunsuppression erhalten hatten, weder eine zelluläre noch eine humorale Abstoßungsreaktion stattfand. Dahingegen war in der Gruppe CR d28 eine akute zelluläre T-Zell-vermittelte Abstoßung BANFF 4IA, bzw. Borderline sichtbar. In CR d56 lag die Gewichtung auf der Borderline-Abstoßung, in einem Präparat der Gruppe konnte ebenfalls die Kategorie BANFF 4IA nachgewiesen werden. In der Gruppe CR + AK d28 war vornehmlich 4IA, bis auf eine Ausnahme von 4IB, zu verzeichnen. Dahingegen war an d56 in CR + AK in vier der sechs untersuchten Präparate keine Abstoßung sichtbar. Zwei Präparate entsprachen den BANFF-Gruppen 4IA bzw. 4IIB.

Versuchsgruppe	Proliferationsindex in %		Anzahl proliferierender T- und B-Lymphozyten		Histopathologischer Befund nach BANFF
	PiT	PiB	CD3 <sup>+</sup> Ki67 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup> Ki67 <sup>+</sup>	
NR d28	4,2	0,5	19,3	1,7	0
CR d28	6,3	3,0	152,7	40,3	4IA bzw. Borderline
CR + AK d28	5,8	4,7	160,5	13,3	4IA bzw. 4IB
NR d56	8,5	0,0	5,8	0	0
CR d56	5,2	2,2	77,2	21,8	0 bzw. Borderline bzw. 4IA
CR + AK d56	6,0	3,0	61,7	6,5	4/6: 0 2/6: 4IA und 4IIB mit V.a. chronisch aktive und akute humorale Rejektion

Tabelle 21: Proliferative Aktivität und histopathologische Einordnung anhand der BANFF-Klassifikation

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die folgende Abbildung 16 dient der Übersicht der erzielten Ergebnisse. In Grau ist die Anzahl der Zellen anhand der Gesichtsfelder und in Blau anhand der Infiltrate dargestellt. Hierbei entspricht die Größe des jeweiligen Zylinders der Anzahl der Zellen. Je nach Zellart wurde hierbei ein anderer Maßstab gewählt. Die Zusammenhänge sind lediglich als Vergleich innerhalb der jeweiligen Zeile zu verstehen. Z.B. sind an d28 sowohl bei der Betrachtung der Gesichtsfelder als auch der Infiltrate weniger CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Gruppe NR als in der Gruppe CR vermessen worden.

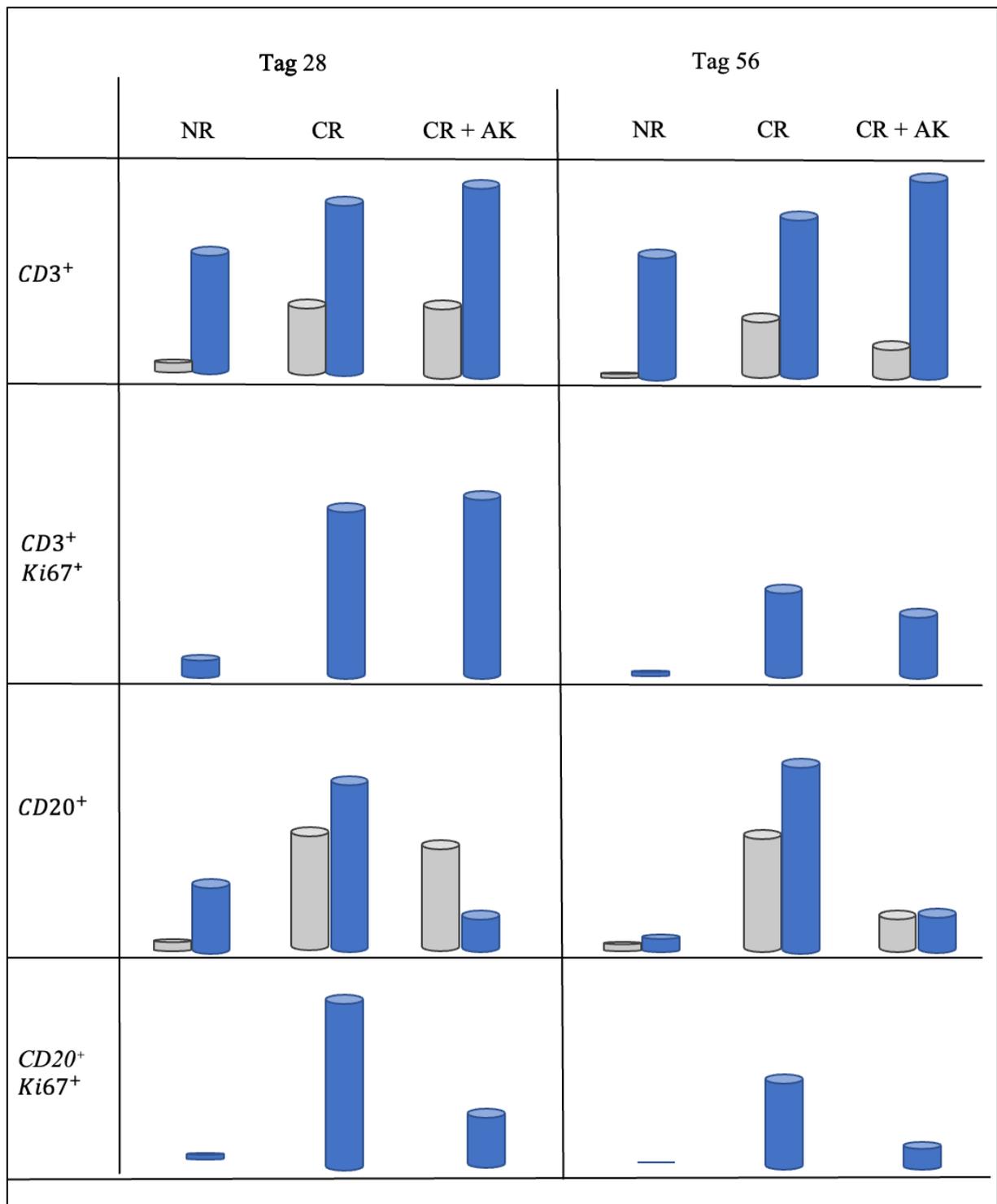


Abbildung 16: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

### 3.5 Organisation der immigrierenden Zellen

Ein weiterer Aspekt, der im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurde, war die Art der Anordnung der immigrierenden Zellen im transplantierten Gewebe. Es war zu prüfen, ob eine strukturierte, wiederkehrende Organisation zu erkennen ist.

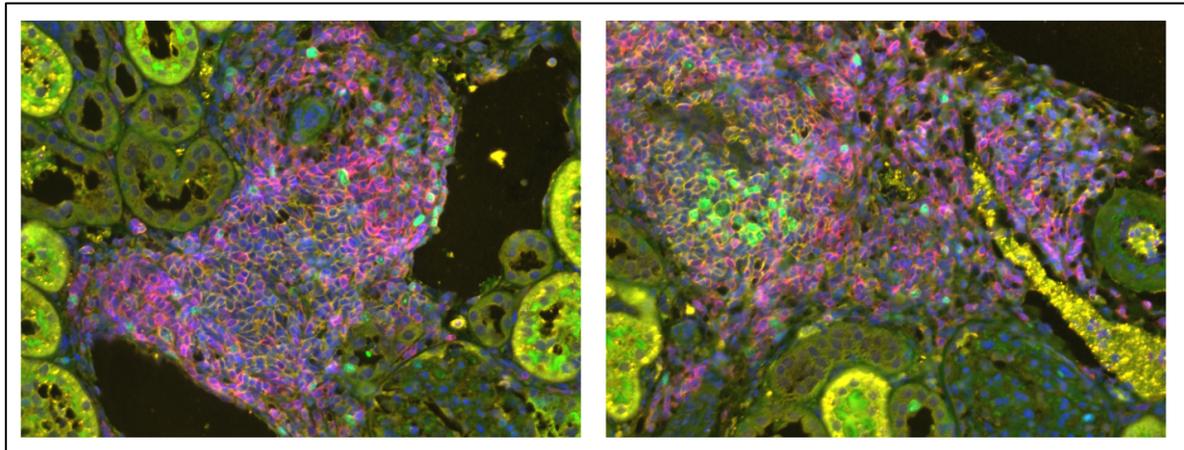


Abbildung 17: Beispielbilder zur Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen. Aus der Gruppe CR d56

In Abbildung 17 wird deutlich, dass sich die in den interstitiellen Raum immigrierten Zellen nach einer bestimmten Struktur anordnen. Der interstitielle Raum ist in der Nierenrinde, sowie medullär zwischen den Glomeruli, Tubuli und Gefäßen gelegen. Die Anordnung immigrierter Zellen wird als Infiltrat bezeichnet. Zu sehen war, dass im Zentrum der abgebildeten Infiltrate vornehmlich B-Lymphozyten, welche anhand der gelben CD20 Färbung verifizierbar sind, zu sehen waren. Diese sind zirkulär von T-Lymphozyten, welche durch die rosa CD3 Färbung in Erscheinung treten, umgeben. Im rechten Bild der Abbildung 17 ist eine Zellansammlung im interstitiellen Raum zu sehen, welche sich ebenfalls durch eine zentrale Ansammlung von B-Lymphozyten auszeichnet. Diese weisen allerdings zusätzlich eine proliferative Aktivität, welche durch die grüne Anfärbung mit Ki67 dargestellt ist, auf. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes Keimzentrum innerhalb eines TLO. Dies spiegelt sich in einem dichten Nukleus aus Ki67<sup>+</sup> proliferierenden Zellen in einer CD20<sup>+</sup> B-Zell-Zone wider. In den untersuchten Schnitten waren nur wenige dieser Art zu finden. In der Gruppe CR d56, aus der die Bilder der Abbildung 17 stammen, waren jedoch einzelne Keimzentren zu vermerken.

Bei der Auswertung der immunhistochemisch behandelten Bilder wurde deutlich, dass in den Gruppen mit 10 mg CyA sowohl an Tag 28 als auch an Tag 56 kaum immigrierte Zellen im Bereich der Nierenrinde zu finden waren. Dahingegen zeigten sich zahlreiche Infiltrate unter

der alternierenden Therapie mit 5 mg CyA. Die Anzahl an Infiltraten war zudem an Tag 56 deutlich höher als an Tag 28. Wurden die Versuchstiere zusätzlich zu 5 mg CyA alternierend mit dem anti-BAFF-AK Belimumab behandelt, konnten allerdings keine TLOs detektiert werden. Weder an d28 noch an d56. Die Zugabe des ISO-AKs an d28 verhinderte erwartungsgemäß nicht das Auftreten von Infiltraten, wenngleich quantitativ wenige Infiltrate, welche als TLOs gewertet werden konnten, zu finden waren. An d56 waren mehr TLOs in der Gruppe CR im Vergleich zu NR zu erkennen. Die Anzahl der TLOs in CR + AK war hingegen geringer als die in NR.

### Organisation d28

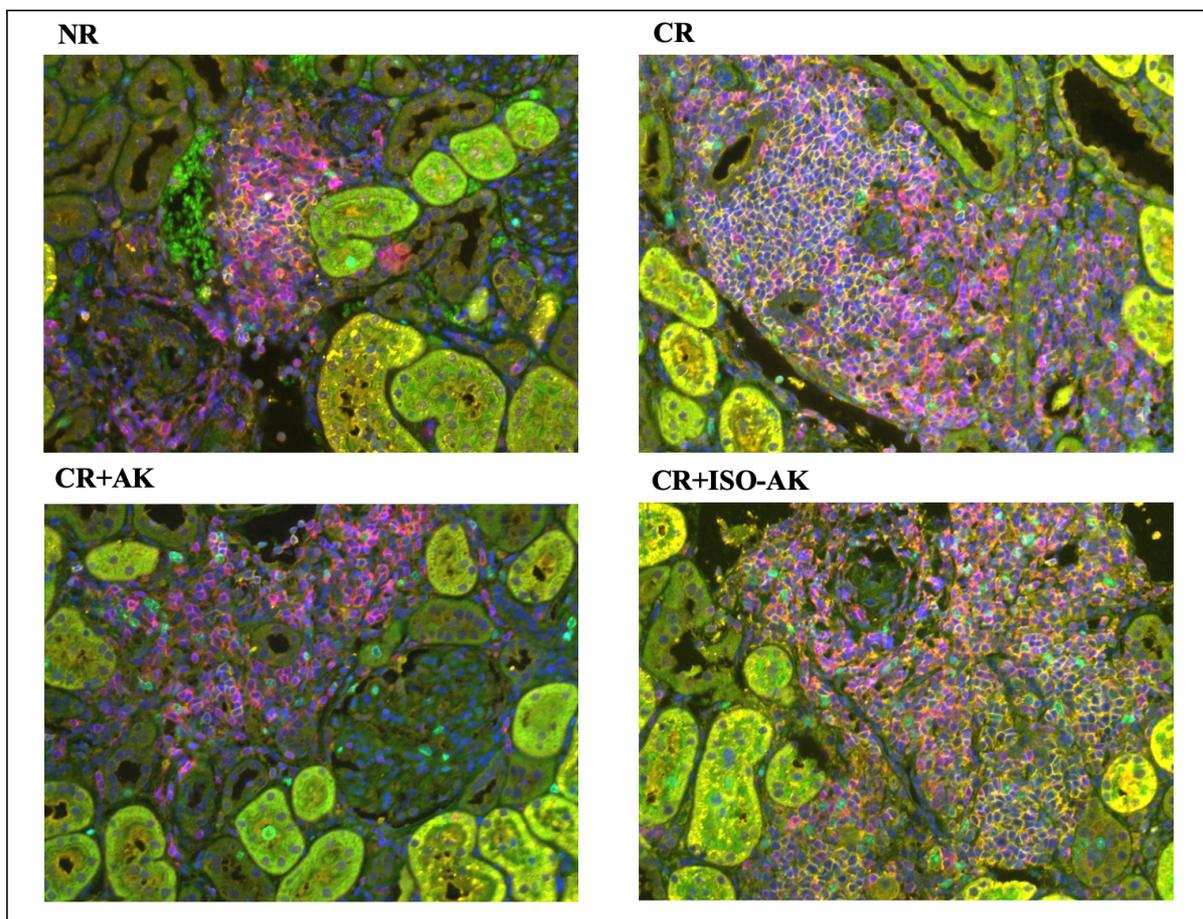


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen anhand der Präparate von d28

In der vorliegenden Abbildung 18 wurden Bilder ausgewählt, welche möglichst das zelluläre Erscheinungsbild der jeweiligen Gruppe repräsentierten. So wurde beispielsweise an d28 sicht-

bar, dass in den Gruppen NR und CR+AK d28 eine relativ lockere Zellansammlung im intersti- tiellen Raum der Nierenrinde nachzuweisen war. Zudem fiel auf, dass es sich bei den Zellen vornehmlich um T-Lymphozyten handelte. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen, die in der Zusammenschau in Abbildung 16 dargestellt wurden. In den Gruppen CR und CR+ISO- AK fiel hingegen eine höhere Dichte an immigrierten Zellen im Bereich der Nierenrinde auf. Außerdem war bei der genaueren Betrachtung von CR d28 die Abgrenzung zwischen einer B- Zellzone (gelb angefärbte CD20<sup>+</sup>B-Lymphozyten) und einer T-Zellzone (rosa angefärbte CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten) zu erkennen. Wie unter Tertiär lymphatische Organe (TLOs) in der Ein- leitung beschrieben ist daher von einer TLO-Formation der immigrierenden Zellen auszugehen.

### Organisation d56

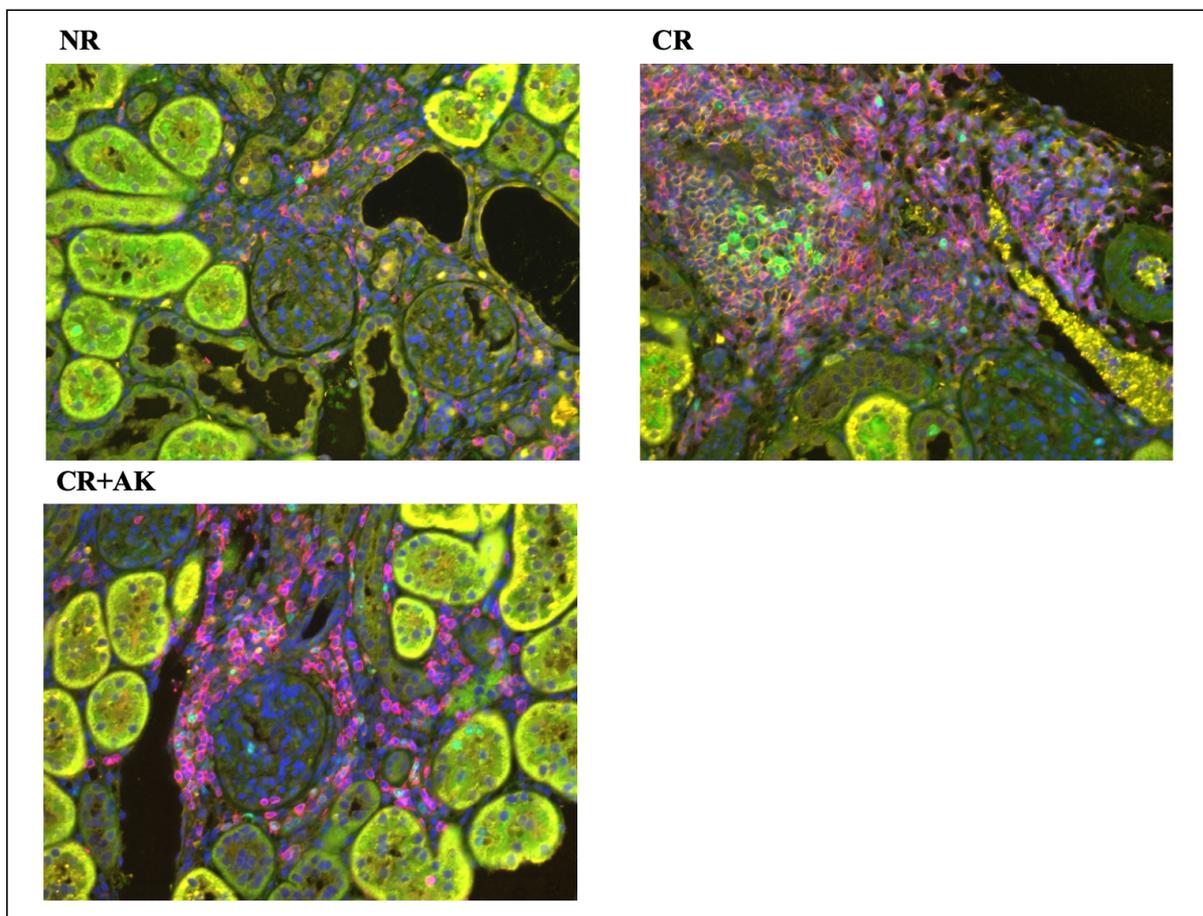


Abbildung 19: Beispielhafte Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen anhand der Präparate von d56

An d56 konnte ebenfalls in der Gruppe CR d56 eine zentrale B-Zellansammlung, zirkulär von einer T- Zellzone umgeben, beobachtet werden. Die sich zentral findenden B-Lymphozyten wiesen allerdings zusätzlich eine proliferative Aktivität, welche durch die additive grüne Anfärbung mit Ki67<sup>+</sup> dargestellt

werden konnte, auf. Hierbei handelte es sich um ein sog. Keimzentrum innerhalb eines TLO. Keimzentren konnten in den untersuchten Schnitten v.a. in der Gruppe CR d56 gesichtet werden. Hier fand aufgrund einer alternierenden CyA-Gabe keine adäquate Immunsuppression statt. Somit konnte die Entstehung von TLOs gefördert werden.

## **4 Diskussion**

In der Transplantationsmedizin lag der Fokus lange Zeit auf der Suche nach Therapieansätzen zur Eindämmung der T-Lymphozyten im Rahmen der Transplantatabstoßung. Aufgrund der Dominanz von ABMR hinsichtlich der chronisch-aktiven Abstoßung und dem damit einhergehenden Transplantatversagen, bei gleichzeitig fehlenden therapeutischen Ansätzen, steht derzeit vor allem die Beeinflussung der B-Lymphozyten-Funktion, respektive deren Aktivierung, im Mittelpunkt der Forschung (115). Zu beachten bleibt jedoch, dass T- und B-Lymphozyten voneinander abhängig sind bzw. sich gegenseitig beeinflussen können (vgl. Einleitung Kapitel 1.2.2). Eine möglichst lange Transplantatüberlebensdauer wird daher nur erreicht, wenn sowohl die Immunantwort der T-, als auch der B-Lymphozyten und damit der wechselseitige „Cross-talk“ in ausreichendem Maße unterdrückt werden kann (116).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch ein experimentelles Design sowohl den Einfluss der unterschiedlichen Therapiearten auf die Anzahl immigrierender Zellen in das Transplantat zu analysieren als auch deren intrarenale Proliferation und Anordnung zu untersuchen. Dafür wurde an insgesamt 39 Versuchstieren eine allogene Nierentransplantation durchgeführt. Durch die unterschiedliche Therapieart und -dauer, der die Versuchstiere nach der Transplantation ausgesetzt waren, war es möglich Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der verwendeten immunsuppressiven Substanzen zu ziehen. Durch die Differenzierung der immigrierten proliferierenden Zellen in proliferierende T-, sowie B-Lymphozyten konnte im Anschluss der Proliferationsindex beschrieben werden. Als Referenzgruppe galt dabei die Gruppe NR („no rejection“), in der die Versuchstiere eine Standardimmunsuppression mit ausreichender Menge an CyA erhielten.

### **4.1 Beeinflussung immigrierender Zellen**

Durch die unterschiedliche Therapieart und -dauer können nun Rückschlüsse auf die mögliche Beteiligung der verschiedenen Zellarten an der Allograftabstoßung gezogen werden. Darüber hinaus ist eine Aussage bezüglich der Wirksamkeit des verwendeten Antikörpers innerhalb des Projektes möglich.

#### 4.1.1 Einfluss Incompliance bzgl. CyA-Einnahme auf T- und B-Lymphozyten

Die immunologischen Eigenschaften der T-Lymphozyten im Rahmen der Allograftabstoßung wurden bereits unter 1.2 in der Einleitung vorgestellt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die standardmäßige immunsuppressive Therapie (NR) sowohl an d28 als auch an d56 signifikant weniger T-Lymphozyten im Vergleich zur alternierenden CyA-Gabe in reduzierter Dosis (CR) gezählt werden konnten (anhand GFs: d28:  $p=0,003$ ; d56:  $p=0,00002$ ). In den Versuchen erhielten die Versuchstiere den Calcineurininhibitor Cyclosporin A. Cyclosporin A wurde bereits 1972 durch Calne et al. als Immunsuppressivum nach Nierentransplantationen erprobt (117). Seither wurde in zahlreichen Untersuchungen eine weitestgehend suffiziente Therapie zur Reduktion der T-Zell-Immigration nach Nierentransplantation entwickelt. Diese ist in den aktuellen Leitlinien der KDIGO wie unter 1.1.4 beschrieben aufgeführt. In den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), welche durch die Nierentransplantationszentren Nordrhein-Westfalen erarbeitet wurden, ist die Applikation von Cyclosporin A als Calcineurininhibitor statt Tacrolimus z.B. im Falle einer ersten Nierentransplantation, bei gutem HLA-Übereinstimmen, einem Anteil Panel-reaktiver Antikörper (PRA)  $< 5\%$ , dem Vorhandensein eines Diabetes mellitus oder einem Body-Mass-Index (BMI)  $> 30 \text{ kg/m}^2$  indiziert (118). In der vorliegenden Arbeit konnte, obwohl es sich um ein HLA-mismatch Modell handelte, durch CyA eine adäquate T-Zellsuppression beobachtet werden. Webster et al. führten 2005 eine Metaanalyse von 30 randomisierten Studien, die insgesamt 4102 PatientInnen einschlossen, durch. Dabei konnten sie zeigen, dass signifikant weniger PatientInnen, die mit Tacrolimus anstatt CyA behandelt wurden, drei Monate nach Transplantation eine akute Transplantatabstoßung aufwiesen (119). Sie zeigten somit, dass Tacrolimus Cyclosporin A bei der Vermeidung einer AR überlegen ist. Im Allgemeinen scheint die Lebenserwartung der PatientInnen und des Transplantats bei beiden Substanzen ähnlich zu sein (120–123). Die Entscheidung, welcher Calcineurininhibitor (CNI) gewählt wird, bleibt jedoch eine individuelle Abwägung je nach Risikoprofil der zu behandelnden PatientInnen.

Halloran et al. legten anhand einer Studie, für die sie Nierenbiopsien im Zeitraum von 3 Tagen bis 35 Jahren nach erfolgter Transplantation entnahmen, dar, dass T-Zell-vermittelte Abstoßungen tendenziell zu frühen Zeitpunkten, wohingegen humoral vermittelte Abstoßungen später, sprich erst nach dem ersten Jahr nach Transplantation, auftraten (124). Dabei waren ABMR im Gegensatz zu TCMR mit einem erhöhten Transplantatverlust assoziiert. Sie berichteten von der überraschenden Erkenntnis, dass es nach 10,2 Jahren zu keiner TCMR-Aktivität mehr kam, wohingegen ABMR weiterhin auftraten. Sie sprechen von einer Art „adaptivem Zustand“, in

dem es nur noch zu ABMR kommt. Späte, reine ABMR können hierbei Ausdruck von Non-Adhärenz sein. Ihre Hypothese ist, dass alle TransplantatempfängerInnen, die unter einer Langzeitimmunsuppression stehen eine adaptive T-Zell-Toleranz entwickeln, und somit deren Möglichkeit, eine TCMR gegen das Transplantat zu entwickeln, versiegt, wohingegen deren Möglichkeit einer anti-HLA-AK-Ausbildung, und der damit einhergehenden ABMR, erhalten bleibt (124).

DSA sind mit der Entstehung einer TCMR, begleitet von einer ABMR und in der Folge mit einem geringen Transplantatoutcome assoziiert. In einer Studie von Chittka et al. konnte beobachtet werden, dass es innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation bei >70% der PatientInnen, bei denen DSA und TCMR nach erfolgter Nierentransplantation auftraten, und die im Anschluss inkompliant bzgl. der Therapie waren, zu einem Transplantatverlust bzw. einem drohenden Transplantatverlust kam. Dahingegen war bei PatientInnen, die adhärenz bzgl. der Therapie waren, ein vergleichbares Outcome zu Vergleichsgruppen, in denen PatientInnen entweder eine TCMR oder DSA aufwiesen, zu vernehmen. Aufgrund der potenziellen Modifizierbarkeit dieses Faktors betonen sie daher ebenfalls die Notwendigkeit PatientInnen mit Schulungen und Beratungen zu erreichen, um das Langzeit-Outcome nach Nierentransplantationen zu verbessern (125). So argumentierte auch der Arbeitskreis um El-Zoghby, dass zellulär vermittelte Abstoßungen innerhalb des ersten Jahres nach erfolgter Transplantation nicht der Immunsuppression an sich, sondern eher der Incompliance der PatientInnen bzgl. der Immunsuppressivaeinnahme zuzuschreiben sind (126). Das Problem der fehlenden Therapieadhärenz liegt in der späten klinischen Manifestation. Der Hauptrisikofaktor für Incompliance ist junges Alter. Methoden, die die Therapieadhärenz messen, wie bspw. das Tablettenzählen, Fragebögen, Patiententagebücher, sowie willkürliche Bestimmungen von Immunsuppressivaspiegeln im Blut, können eine falsch hohe Adhärenz widerspiegeln (127). Nach Tong et al. sind folgende Faktoren für eine Non-Adhärenz bzgl. der Medikamenteneinnahme nach Nierentransplantation von Bedeutung: die Ablehnung der Therapie, Lebensereignisse, Vergesslichkeit, Nebenwirkungen, Kosten, schwere Erreichbarkeit einer Apotheke (128).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln diesen Sachverhalt ebenso wider. Die alternierende CyA-Gabe führte zu einem deutlichen Anstieg der T-Lymphozytenzahl im Vergleich zur Standardimmunsuppression in den NR-Gruppen. Es wurde ersichtlich, dass die fehlende Adhärenz bzgl. der Immunsuppression bereits innerhalb der ersten zwei Monate nach Transplantation zu einer vermehrten T-Zellimmigration in das Transplantat führte. Bei der Betrachtung der Gesichtsfelder an d28 und d56 konnte zudem eine signifikant höhere Anzahl an B-

Zellen in der Gruppe mit alternierender Immunsuppression (CR) verglichen mit der Gruppe der Standardimmunsuppression (NR) gezählt werden (d28:  $p=0,02$ ; d56:  $p=0,001$ ). Dies unterstreicht die zuvor getätigte Aussage. Durch die inkonsequente CyA-Verabreichung konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten auch eine höhere B-Lymphozytenzahl im Vergleich zur regelmäßigen Einnahme wahrgenommen werden.

#### **4.1.2 Einfluss anti-BAFF-Antikörper Belimumab auf T- und B-Lymphozyten**

Innerhalb dieser Arbeit war zu beobachten, dass es durch den Einsatz von Belimumab im Vergleich zur Standardimmunsuppression sowohl an d28 als auch d56 zu einer signifikant (anhand GFs:  $p<0,001$ ) höheren Anzahl an T-Lymphozyten kam. Im Vergleich zu CR d28 übte Belimumab (in CR+AK) an d28 ebenfalls keinen hemmenden Einfluss auf die Anzahl der in das Transplantat immigrierenden T-Lymphozyten aus. An d56 konnte bei der Betrachtung der Gesichtsfelder jedoch eine Reduktion der T-Lymphozyten in CR+AK d56 beobachtet werden. Dies war von statistischer Signifikanz. Auffällig war, dass in der Gruppe CR + AK d56 bei der Betrachtung der Gesichtsfelder eine erniedrigte, bei der Auswertung der Infiltratflächen hingegen eine erhöhte CD3<sup>+</sup>T-Lymphozytenzahl gezählt werden konnte. Dieser Sachverhalt lässt sich vermutlich durch die höhere Zelldichte innerhalb der Infiltrate im Vergleich zu den Gesichtsfeldern erklären. Es konnte somit kein eindeutiger Einfluss von Belimumab auf die Anzahl immigrierender T-Lymphozyten beobachtet werden. Das ist in erster Linie durch die spezifische Wirkung des anti-BAFF-Antikörpers auf die B-Lymphozyten zu erklären.

Der unspezifisch bindende Iso-AK hatte im Vergleich zur alleinigen alternierenden CyA-Gabe ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl der immigrierenden T-Lymphozyten.

Dass B-Lymphozyten maßgeblich an der Entwicklung einer ABMR beteiligt sind, konnte bereits im Jahr 1993 durch die Arbeitsgruppe von Sawyer et. al. gezeigt werden. Sie kamen zu der Erkenntnis, dass durch den alleinigen Einsatz von Cyclosporin A keine Suppression der frühen Antikörperantwort erzielt werden kann (129).

Die Inflammation ist, wie in der Einleitung beschrieben, maßgeblich an der immunologischen Antwort beteiligt. Diese spielt sowohl bei Infektionen und Malignomen als auch in der Transplantationsmedizin eine Rolle. Die Inflammation wird durch Zytokine, Chemokine, etc. initiiert, sowie kontrolliert. Eines der wichtigsten Zytokine in der B-Lymphozyten Homöostase und deren Überleben ist wie o.g. der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF. BAFF gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). Diesen Mechanismus macht man sich in einigen Bereichen

der Medizin bereits zunutze, indem diese regulatorischen Proteine durch zielgerichtete Biologicals inhibiert werden. So nutzt man in der Therapie der rheumatoiden Arthritis beispielsweise den TNF als Angriffspunkt (130,131). Beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) sind die BAFF-Level, auch BLyS genannt, deutlich erhöht. Sie werden durch die Verwendung des anti-BAFF-Antikörpers Belimumab als Angriffspunkt zur Regulation der B-Zell-Aktivierung genutzt.

Der Einsatz des anti-BAFF-Antikörpers führte in dieser Arbeit sowohl bei der Betrachtung der Gesichtsfelder als auch der Infiltrate zu einer deutlichen Reduktion der B-Lymphozyten im Vergleich zur alleinigen alternierenden CyA-Gabe (CR d28 vs. CR+AK d28). An d56 war dieser Unterschied gemessen anhand der Gesichtsfelder von statistischer Relevanz (anhand GFs: CR d56 vs. CR+AK d56:  $p=0,032$ ). Anhand der Infiltratbetrachtung war dieser zu beiden Zeitpunkten statistisch relevant (anhand Infiltrate: CR d28 vs. CR+AK d28:  $p=0,001$ ; CR d56 vs. CR+AK d56:  $p=0,001$ ). Daraus konnte geschlossen werden, dass der anti-BAFF-AK Belimumab, der bisher lediglich im Bereich der Rheumatologie zur Behandlung des Systemischen Lupus Erythematoses eingesetzt wird, auch im Rahmen der Allograftabstoßung einen modulierenden Effekt auf die Anzahl der immigrierenden B-Lymphozyten ausüben kann. Auch im Vergleich zur Standardimmunsuppression konnte an d28 eine Wirkung auf die Anzahl immigrierender CD20<sup>+</sup> B-Lymphozyten beobachtet werden. Der Einsatz des anti-BAFF-Antikörpers (CR+AK d28) ergab bei der Zellzählung anhand von Infiltraten eine nicht signifikante Reduktion der B-Zellzahl im Vergleich zu NR d28 (CR+AK d28 vs. NR d28;  $p=0,373$ ). Dagegen war die Anzahl immigrierter B-Lymphozyten in der Gruppe NR d28 im Vergleich zu CR+AK d28 anhand der Gesichtsfelder signifikant kleiner ( $p=0,014$ ). Auch hier sind die unterschiedlichen Ergebnisse der Gesichtsfeld- und Infiltratbetrachtung a.e. dadurch zu erklären, dass sich die B-Lymphozyten vornehmlich innerhalb von Infiltraten befanden. Beim Vergleich der B-Lymphozytenzahl der Gruppen NR d56 und CR+AK d56 konnte durch die kontinuierliche CyA-Gabe in NR d56 eine deutlich niedrigere B-Lymphozytenzahl im Vergleich zu CR + AK d56 beobachtet werden (anhand GFs:  $p=0,233$ ). An d56 war dieser Sachverhalt auch bei der Betrachtung der Infiltrate zu vernehmen. Auch hier war keine statistische Signifikanz nachweisbar (NR vs. CR+AK d56 anhand Infiltrate:  $p=0,126$ ). So schien hier die alleinige Immunsuppression mit CyA einen höheren Effekt auf die Zahl der immigrierenden B-Lymphozyten im Vergleich zur Anwendung des anti-BAFF-AKs zu haben.

Auch andere Forschungsgruppen untersuchten bereits den Einsatz von Belimumab im Bereich der Nierentransplantation. Banham et al. verabreichten zwischen 2013 und 2015 PatientInnen

im Rahmen von Nierentransplantationen zur erweiterten Induktionstherapie den anti-BAFF-AK Belimumab. Hierbei konnte durch Belimumab im Vergleich zu Placebo keine signifikante Reduktion der naiven B-Zellen erzielt werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass Belimumab zwar keinen maßgeblichen Benefit im Hinblick auf die Beeinflussung der naiven B-Zellen bringt, dessen Einsatz jedoch auch keine zusätzlichen Risiken bzgl. der Entwicklung einer opportunistischen Infektion birgt (110).

Furie et al. veröffentlichten im Jahr 2020 die „Belimumab International Study in Lupus Nephritis (BLISS-LN)“ Studie (132), nachdem in den vorangegangenen Studien BLISS-52 und BLISS-76 PatientInnen mit akuter Lupus-Nephritis explizit ausgeschlossen waren (133,134). Es handelt sich um eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie, die einen positiven Effekt von Belimumab bei PatientInnen mit aktiver Lupus-Nephritis zeigen konnte. Die Wirksamkeit von Belimumab war bei PatientInnen mit proliferativer Lupus-Nephritis am größten. Der positive Effekt äußerte sich in einer signifikanten Verstärkung der renalen Antwort im Vergleich zu Placebo. Zudem waren weniger Krankheitsschüben zu vernehmen (132).

Auch bei PatientInnen, die vom primären Sjögren-Syndrom betroffen sind, wurden erhöhte BAFF-Level im Serum festgestellt. Der Einsatz eines anti-BAFF-Rezeptor-AKs in Monotherapie, gefolgt von einer anti-CD20-AK-Monotherapie mit Rituximab konnte zu einer langfristigen Reduktion des Lymphomrisikos und des Auftretens von kryoglobulinämischen Vaskulitiden führen. Zudem kam es zu einer anhaltenden Normalisierung der initialen B-Zellhyperaktivität, sowie zum Abschwollen der Speicheldrüsen (135).

Innerhalb der Arbeitsgruppe Dr. Bergler am Universitätsklinikum Regensburg konnte im Rahmen einer Publikation gezeigt werden, dass durch die Applikation von Belimumab im Felde der experimentellen allogenen Nierentransplantation eine geringere Expression von BAFF-Rezeptoren im Transplantat zu messen war (136). Belimumab steht für die Einleitung der Apoptose, sowie die Reduktion der Differenzierung und Ausreifung von B-Zellen, wodurch die Produktion von Plasmazellen verhindert wird (137,138).

Neben dem im vorliegenden Projekt verwendeten anti-BAFF-Antikörper wurden in zahlreichen Arbeitsgruppen Erfahrungen mit dem Antikörper Rituximab gesammelt (139,140). Genberg et al. untersuchten die Auswirkungen einer einmaligen präoperativen Rituximabgabe, zusätzlich zur Standardimmunsuppression, auf die B-Zell-Population im peripheren Blut, sowie im Lymphknoten und Transplantat. Sie konnten beobachten, dass bei 88% der PatientInnen, die Rituximab erhielten, eine vollständige Depletion der B-Lymphozyten im peripheren Blut erreicht werden konnte. Immunhistochemisch konnten keine B-Zellen im Nierengewebe mehr

nachgewiesen werden (140). Die Arbeitsgruppe um Thauat beschrieb ebenfalls eine adäquate B-Zell-Depletion im peripheren Blut. Sie sehen Rituximab als eine „potente therapeutische Option“ im Kampf gegen die chronische Inflammation und die damit verbundene Ausbildung von TLOs (141). Sie konnten jedoch zeigen, dass zahlreiche B-Lymphozyten in TLOs der durch Rituximab induzierten Apoptose entkommen konnten.

Im Jahr 2003 wurde die ABMR erstmals mit in die BANFF-Klassifikation aufgenommen (142). Lachmann et al. berichteten bereits 2009 über die Rolle von HLA-Antikörpern und DSA als potentielle Biomarker für die chronische Abstoßung nach erfolgter Nierentransplantation (143,144). Die Forschungsgruppe um ihn beobachtete ein deutlich reduziertes Langzeitorganüberleben nach Nierentransplantation, wenn dnDSA vorhanden waren. Bei DSA handelt es sich um einen weit verbreiteten Surrogat-Marker der ABMR. Durch ihn werden jedoch lediglich 30 – 40 % der PatientInnen mit ABMR erfasst (145). Gosset et al. zeigten, dass zirkulierende DSAs, unabhängig davon, ob eine akute Abstoßung stattgefunden hat, verantwortlich für die Fibrosierung des Transplantats sind (146,147).

Durch zunehmende Belege, dass akute und chronische Allograftabstoßungen auch nach Transplantation HLA-identischer Geschwisterpaare auftreten können (148), wird deutlich, dass Immunreaktionen gegen non-HLA-AKs ebenfalls von hoher Bedeutung sind. Non-HLA-AKs können als Auto- oder Alloantikörper im Rahmen von Organtransplantationen auftreten. Sie richten sich gegen diverse MHC-Antigene, Gefäßrezeptoren, Adhäsionsmoleküle etc. und können als komplementbindende und nichtkomplementbindende Antikörper fungieren. Dadurch ist eine Vielzahl an Schädigungsmustern zu beobachten (149). Zu non-HLA-Antigenen, die zu einem Transplantatschaden führen, zählen u.a. Agrin, Vimentin, Perlecan, Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor etc. (150). So geht das Vorhandensein von AT1-Rezeptor-Antikörpern vor Transplantation beispielsweise mit einem vermehrten Auftreten von DSA positiven ABMRs einher (151).

Da der erste Berührungspunkt des Empfängerimmunsystems mit dem Transplantat das Gefäßendothel darstellt, geht man davon aus, dass non-HLA-anti-Endothelzell-AKs (AECAs) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Allograftrejektion einnehmen (152). Jackson et al. konnten innerhalb ihres Projektes zeigen, dass AECAs zu einer Aktivierung des Gefäßendothels, einer Verstärkung der Alloimmunreaktion und zu einer ausgeprägten mikrovaskulären Schädigung führten (152). Der Nachweis von AECAs vor Transplantation erhöht bei Empfängern mit HLA-Sensibilisierung die Wahrscheinlichkeit diejenigen zu identifizieren, die ein höheres Risiko für eine Allotransplantatabstoßung haben.

In der Literatur wurden unterschiedliche Aussagen bzgl. des Outcomes von chronisch aktiver ABMR getätigt. So ist das Vorhandensein von DSA zur Diagnosestellung einer chronisch aktiven ABMR im Rahmen der BANFF-Klassifikation weiterhin notwendig. Forschende, so auch Sablik et al., konnten zeigen, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in der klinischen Beurteilung, der Verschlechterung der Allograftfunktion und dem Überleben von Nieren-Allotransplantaten in Fällen mit oder ohne DSA zu beobachten waren (153). Die untersuchten Fälle zeigten alle chronische histomorphologische Schäden und Entzündungen auf, unabhängig vom Vorhandensein von DSA.

Die Diagnosestellung einer ABMR basiert auf dem Vorhandensein von Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation (124). Diese sind jedoch wenig spezifisch. Genauso gilt der Nachweis von C4d als Kriterium zur Diagnosestellung einer ABM als wenig sensitiv (154–157). Es besteht die Problematik, dass 50% der ABMRs aktuell nicht detektiert werden, da sie C4d negativ sind. Sie werden fälschlicherweise bspw. der chronischen Allograftnephropathie oder Calcineurininhibitortoxizität zugeschrieben (78,158–160). Daher wurde im Rahmen des 12. Updates der BANFF-Klassifikation 2013 die C4d negative ABMR mit aufgenommen (47).

Einen Ansatz zur Komplementinhibition bei ABMR im Rahmen von Nierentransplantationen bietet bspw. Eculizumab. Dabei handelt es sich wie bereits in der Einleitung beschrieben um einen monoklonalen Antikörper. Der Einsatz von Eculizumab zur Therapie und Prävention einer akuten ABMR führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es konnte einerseits beobachtet werden, dass die Inzidenz einer akuten ABMR innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation reduziert werden konnte (161). Einer anderen Studie zufolge konnten nach 12 Monaten keine signifikanten Unterschiede der Scores für C4d, chronische Glomerulopathie oder peritubuläre Kapillaritis zwischen der Eculizumab- und der Kontrollgruppe vernommen werden (162). Diese Erkenntnisse lassen annehmen, dass Eculizumab in den ersten Wochen und Monaten nach Transplantation einen präventiven Einfluss auf eine akute ABMR nehmen kann.

Heidt et al. untersuchten den Effekt verschiedener Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Cyclosporin A) auf T- und B-Lymphozyten. Sie konnten zeigen, dass CNI die humorale Immunantwort von PatientInnen, welche einer Transplantation unterzogen wurden, beeinflussten, indem sie auf die Signalwirkung von T-Helferzellen und nicht direkt auf B-Lymphozyten einwirkten (163). Calcineurininhibitoren waren somit nicht in der Lage die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten und somit die Aktivierung der B-Lymphozyten direkt zu unterdrücken.

Wie schon mehrfach angeschnitten ist vor allem die Interaktion der T- und B-Lymphozyten entscheidend für die Entstehung einer Transplantatabstoßung. Es ist zu berücksichtigen, dass

beim Gesunden das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten in der peripheren Blutbahn bei 70-80 % zu 20-30% liegt (164). Die T-Zell-vermittelte B-Zellaktivierung läuft beispielsweise über drei immunologische Signalwege ab. Initial findet eine B-Zellaktivierung durch das Alloantigen statt. Hierbei wird das Alloantigen in die B-zellreiche B-Zell-Zone des Nierenkortex eingeschleust. Diese B-Zellen haben die Fähigkeit membrangebundene und lösliche Alloantigene, so auch bspw. den B-Zell-Rezeptor, zu erkennen. Innerhalb des ersten Schrittes kommt es zu einer Bindung des Alloantigens an den B-Zell-Rezeptor. Hierdurch wird eine Kaskade über den CD19-Komplex aktiviert. Der B-Zell-Rezeptor ist zudem für die Endozytose von Alloantigenen, die über den MHC II Komplex präsentiert werden, zuständig. Vorbereitete B-Zellen werden in die T-Zell-Zone im Bereich des Parakortex überführt. Nur die B-Zellen, welche mit den folliculären T-Helferzellen interagieren, erhalten weitere Aktivierungsstimuli. Der zweite Pfad ist durch eine Costimulation von B- und T-Helfer-Zellen, die letztendlich zu einer B-Zellaktivierung führt, charakterisiert. Der dritte Weg läuft über den Einfluss von Zytokinen auf die B-Zell-Aktivierung ab. Diese Zytokine werden von multiplen T-Helferzellen produziert (165).

Zur gezielten Inhibierung der Kommunikation zwischen T- und B-Lymphozyten wurde Belatacept als selektive Targettherapie, die gegen CD28-CD80/CD86 gerichtet ist, im Rahmen der Nierentransplantation erprobt. Im Rahmen der BENEFIT-extend Studie wurde belegt, dass eine Belatacept-Therapie im Vergleich zur CNI-Therapie innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation mit einem erhöhten Risiko für akute TCMR einhergeht (166). Die Nierenfunktion war jedoch besser im Vergleich zu den PatientInnen, die mit einem CNI therapiert wurden. Die PatientInnen entwickelten nach Transplantation seltener einen Diabetes mellitus, wiesen ein Jahr nach der Transplantation bessere Blutdruckwerte und ein besseres Lipidprofil auf (167). Zudem waren innerhalb der ersten sieben Jahre nach Transplantation bei den PatientInnen, die mit Belatacept anstatt Cyclosporin A therapiert wurden, signifikant weniger dnDSA, und weniger IF/TA vernommen worden (168).

In der Studie von Tse et al. aus dem Jahr 2015 wurde belegt, dass die Reduktion der B-Lymphozyten auch eine Reduktion der T-Lymphozyten bewirkt (169). Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, scheint jedoch wichtig für weitere Therapieansätze im Kampf gegen die chronische Transplantatabstoßung zu sein.

## 4.2 Proliferation, Proliferationsindex

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag in der Betrachtung der proliferierenden Zellen. So konnte gezeigt werden, dass lediglich die Standardimmunsuppression (NR) für die Abwesenheit proliferierender Zellen sorgen konnte. Wie unter dem Punkt Proliferierende Ki67<sup>+</sup>-Zellen im Ergebnisteil sichtbar, konnte ausschließlich an d28 zwischen den Gruppen NR d28 und CR+AK d28 ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. An Tag 56 konnten somit keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Anzahl unspezifisch proliferierender Zellen gegenüber der Vollimmunsuppression festgestellt werden. Die alternierende CyA-Gabe führte sowohl an d28 als auch an d56 zu einer signifikant höheren Zahl Ki67<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu NR. Der additive Antikörper Belimumab konnte ausschließlich bei der Betrachtung der Gesichtsfelder an d56 zu einer statistisch signifikant niedrigeren Zahl Ki67<sup>+</sup>Zellen im Vergleich zu CR d56 führen.

Des Weiteren wurde die Differenzierung der proliferierenden Zellen betrachtet. Grundsätzlich fiel auf, dass in allen betrachteten Gruppen an d56 die absolute Anzahl proliferierender Zellen geringer als an d28 war. Neben der Quantität der proliferierenden Zellen wurde im Anschluss deren lymphozytäre Orientierung analysiert. Dabei ließ sich beobachten, dass die additive anti-BAFF-AK-Therapie an d28 keinen wesentlichen Einfluss auf die proliferierenden T-Lymphozyten im Vergleich zur alleinigen alternierenden CyA-Gabe ausübte. Die effizienteste Eindämmung der proliferierenden T-Lymphozyten erfolgte auch hier mit Hilfe der standardmäßigen Immunsuppression in der Gruppe NR d28. An d56 führte diese Art der Therapie zu einer deutlich geringeren Reduktion der CD3<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>-Zellen. An d56 waren hingegen generell wenig T-Lymphozyten vorhanden. Im Verhältnis war hier jedoch ein höherer Anteil proliferativ aktiv (CD3<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>). Dieser Effekt war nicht von statistischer Relevanz.

Bei der Betrachtung der proliferierenden B-Lymphozyten fiel auf, dass an d28 unter Standardimmunsuppression (NR d28) fast keine, und an d56 unter den besagten Umständen keine B-Zell-Proliferation nachzuweisen war. Die anti-BAFF-AK-Therapie hatte zu beiden Zeitpunkten keinen Einfluss auf die proliferierenden B-Lymphozyten. Die zuvor beschriebene Wirkung von Belimumab auf B-Lymphozyten ist im vorliegenden Projekt somit auf nicht proliferierende B-Lymphozyten beschränkt.

### Ansatz Proliferationsindex:

Den Proliferationsmarker Ki67 machten sich bereits 1998 Bosch et al. als prognostischen Faktor im Rahmen des Mantelzell-Lymphoms zunutze (170). So ist die Proliferationsrate, gemessen in Prozent, fester Bestandteil z.B. bei der Diagnostik und Therapie des Plasmozytoms, Mamma-, und Prostatakarzinoms. Hier wird der Tumor der PatientInnen vor Therapiebeginn auf seine Proliferationsrate (Ki67) getestet. Ein hoher Ki67-Prozentwert und die daraus hervorgehende hohe proliferative Aktivität eines Gewebes geht z.B. im Falle eines Mamma-Karzinoms mit einem erhöhten Risiko eines Rezidivs und einer geringeren Überlebensrate, sowohl in Hormonrezeptor positiven als auch negativen Fällen einher (171). Aufgrund der stark schwankenden Inter- und Intraobserver-Validität bzgl. der Bestimmung des Proliferationsindex, ist dieser auch in der Onkologie nie isoliert zu betrachten.

In der Transplantationsmedizin fand der Proliferationsindex bislang wenig Bedeutung. Eine Analogie ist z.B. anhand der genaueren Betrachtung des multiplen Myeloms möglich. Das multiple Myelom ist durch eine erhöhte Anzahl an monoklonalen Immunglobulinen charakterisiert. BCMA (B cell maturation antigen) ist auf der Oberfläche von Plasmazellen der Multiplen Myelom PatientInnen exprimiert. BAFF und APRIL (A proliferation-inducing ligand) gehören beide der TNF-Familie an. Die Rezeptoren der genannten Liganden sind der BAFF-Rezeptor und TACI. Diese sind dem BCMA verwandt. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben sind im Rahmen der chronischen Transplantatabstoßung erhöhte BAFF-Level zu beobachten. BAFF bindet an drei spezifische Rezeptoren auf B-Zellen: 1. BAFF-Rezeptor, 2. TACI (transmembrane activator calcium modulator und cyclophilin ligand interacteur), und 3. BCMA. BAFF bindet in normalen Zellen an BCMA, um das Zellüberleben, die Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion zu verstärken (68,172).

Im Bereich der Multiplen Myelom-Forschung wurden bereits zahlreiche monoklonale Antikörper, z.B. Daratumumab und Elotuzumab, mit dem Ziel der Beeinflussung von BCMA und der damit einhergehenden Reduktion der Proliferation maligner Zellen, erprobt (173). BCMA scheint als ein geeignetes Zielmolekül in der Immuntherapie zu fungieren, da es spezifisch angegriffen werden kann, und es zu weniger systemischen und lokalen Begleiterscheinungen als bei bisherigen Therapien kommt (173).

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der Anteil proliferierender T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten als auch der Anteil proliferierender B-Lymphozyten an der Gesamtzahl der B-Lymphozyten untersucht. Daraus konnte der jeweilige Proliferationsindex

berechnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass unter den T-Zellen an d28 in allen Gruppen eine geringe proliferative Aktivität herrschte (PiT d28: 4,2 – 6,5 %). An d56 sah man hingegen, dass die Vollimmunsuppression in der Gruppe NR d56 zu einer prozentual höheren Zahl proliferierender T-Lymphozyten (8,5%) im Vergleich zu den Gruppen CR d56 (5,2%), sowie CR + AK d56 (6,0%) führte.

Bei der Betrachtung der B-Lymphozyten fiel auf, dass an d28 in Gruppe NR ein sehr geringer Anteil der gezählten B-Lymphozyten eine proliferative Aktivität aufwies (0,5%). In den Gruppen, in denen den Versuchstieren der Calcineurininhibitor CyA nicht kontinuierlich verabreicht wurde, sprich CR d28, CR + AK d28 und CR + ISO-AK d28, war dieser Anteil mit 3,0%, 4,7% und 2,7 % etwas höher. An d56 wurden in der Gruppe NR ohnehin sehr wenig CD20<sup>+</sup>-B-Lymphozyten gezählt, unter ihnen war keinerlei proliferative Aktivität zu erkennen.

Generell fiel auf, dass der Anteil an proliferierender T-Lymphozyten höher war als der an proliferierenden B-Lymphozyten.

#### Proliferationsindex und histopathologische Einordnung nach der BANFF-Klassifikation:

In der Wissenschaft war der folgende Sachverhalt in Bezug auf die chronische Allograftabstoßung bisher nicht untersucht worden. So wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl der errechnete Proliferationsindex als auch die histopathologische Einstufung in die BANFF-Klassifikation herangezogen, um einen möglichen Zusammenhang festzustellen. Es wurde sichtbar, dass sich in den Gruppen, in denen der Proliferationsindex sowohl für die T- als auch B-Lymphozyten bei > 0,5% lag, histopathologische Veränderungen nachweisen ließen. In den Gruppen unter Standardimmunsuppression (NR d28 und d56) war histopathologisch weder eine zelluläre noch humorale Abstoßung zu erkennen. Diese Erkenntnisse decken sich auch mit den vorher beschriebenen Sachverhalten. Histopathologisch konnten an d28 in der Gruppe CR+AK BANFF IA bzw. IB, und an d56 in CR+AK in zwei der sechs vorhandenen Schnitte BANFF 4IA und 4IIB nachgewiesen werden. Diese Veränderungen sprechen für eine akute TCMR und gehen mit einer interstitiellen Entzündung und einer mäßigen/schweren Tubulitis einher. Bei Typ IIB zählt zudem eine schwere Intimaarteriitis zu den Diagnosekriterien.

Eine elementare Hilfestellung bei der histologischen Einordnung der zellulären bzw. humoralen Transplantatabstoßung gibt die BANFF-Klassifikation von 1997, welche zuletzt im Jahr 2019 überarbeitet wurde (174). Diese befindet sich im Anhang.

Wider Erwarten konnte in den Gruppen mit CR histopathologisch keine TCMR gesichert werden. In den Gruppen CR+AK d28 und d56 konnten anteilig mehr proliferierende T-Lymphozyten an der Gesamtzahl proliferierender Zellen gezählt werden. Die absolute Anzahl an T-Lymphozyten war zudem im Vergleich zur B-Lymphozytenzahl deutlich höher. So ergibt sich die Frage, ob die verwendete Methodik eine sinnvolle Interpretation der Zusammenhänge ermöglicht. Auch hier sind als Limitation die intra- und interindividuellen Unterschiede der BetrachterInnen zu berücksichtigen.

### **4.3 Organisation immigrierender Lymphozyten**

Die Anordnungen der T- und B- Lymphozyten innerhalb der Gewebeproben glichen teils den Strukturen der sekundär lymphatischen Organe wie z.B. in der Milz und den Lymphknoten. Tertiär Lymphatische Organe entstehen nach aktuellem Stand der Wissenschaft durch Infektionen, autoimmune Prozesse, Krebsleiden und Transplantatabstoßungen. Diese Infiltrate beinhalten Keimzentren (175). Laut Thauat et al. unterscheiden sich die TLOs in Transplantaten v.a. in den folgenden drei Punkten von SLOs: 1. durch die erhebliche Anzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren (inkl. BAFF), die für das Überleben von B-Zellen notwendig sind, 2. die kontinuierliche Freisetzung von Alloantikörpern durch das geschädigte Transplantat, sowie 3. der lokalen Fehlregulation der Immunantwort, die zu einer massiven Immunantwort innerhalb der TLOs und somit zur Transplantatabstoßung führen kann. Tertiär lymphatische Strukturen wurden in fast allen Arten humaner Transplantate, die aufgrund einer chronischen Allograftrejektion in deren Studie explantiert werden mussten, gefunden (176).

Eine TLO-Formation wurde bereits im Rahmen von Herztransplantationen u.a. durch Baddoura et al. beobachtet (177). Im Bereich der Nierentransplantationen hinkt die Forschung in diesem Bereich v.a. aufgrund der erschwerten Bedingungen einer aussagekräftigen Biopsiegewinnung hinterher.

In dieser Arbeit ist die Gruppe, welche die chronische Rejektion an d56 darstellt (CR d56), hervorzuheben. Hier war in einigen Schnitten das Vollbild eines TLOs inklusive Keimzentrum zu detektieren. Daraus ist abzuleiten, dass durch eine längere inadäquate Immunsuppression, wie sie in der klinischen Situation einer anhaltenden Non-Adhärenz Bestand haben kann, eine zunehmende Durchsetzung des Transplantates mit T- und B-Lymphozyten und eine daraus resultierende chronische Abstoßungsreaktion zu erwarten ist. Diese kann additiv auch mit einer Ausbildung von TLOs einhergehen.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz eines anti-BAFF-Antikörpers die TLO-Entstehung innerhalb der chronisch abgestoßenen Nierentransplantate verhindert werden kann. In der Literatur wurde BAFF bisher als einflussnehmender Faktor auf B-Lymphozyten betrachtet. Wie in der Einleitung beschrieben, sind neben dem B-Zell-aktivierenden Faktor noch weitere Mediatoren zur Stimulation der B-Lymphozyten und in der Folge deren Antikörperproduktion gegen das Transplantat möglich. So u.a. APRIL.

Der Einsatz von Rituximab führte, wie oben bereits beschrieben, zu einer kompletten Elimination von in der peripheren Blutbahn zirkulierenden B-Lymphozyten. TLOs innerhalb der Transplantate blieben hingegen unberührt. Zudem konnte eine vermehrte Expression von BAFF innerhalb chronisch abgestoßener Transplantate nachgewiesen werden (141). Deutlich wird hier also ebenfalls, dass eine gezielte Beeinflussung einzelner Zellpopulationen im Kampf gegen die chronische Allograftrejektion nicht ausreichend ist (178).

In weiteren Veröffentlichungen, so z.B. von Bath et al. konnte durch den Einsatz eines Antikörpers gegen APRIL/BLyS eine reduzierte Antikörperproduktion und eine verringerte Ausbildung intrasplenischer Keimzentren beobachtet werden. Interessanterweise konnte kein Einfluss auf die lymphozytäre Infiltration des chronisch abgestoßenen Nierentransplantats beobachtet werden (179). Dies erklärt sich die Arbeitsgruppe durch die Monotherapie. Durch den Zusatz eines auf die T-Lymphozyten einwirkenden Immunsuppressivums sähe die Histologie nach ihrer Meinung anders aus.

TLOs wurden auch zuvor schon in chronisch abgestoßenen Organen detektiert. Thauinat et al. konnte bspw. ein Monat nach der Transplantation einer körperfremden Aorta eine Rejektion mit Ausbildung von TLOs beobachten (74). Die immigrierten Zellen fanden sich dabei in einer hoch organisierten Formation, die als Voraussetzung eines TLOs gilt, wider (180,181).

Trotz der Stimmen, die besagen, dass die TLO-Bildung mit einer chronischen Transplantatrejektion und einem schlechteren Transplantatoutcome einhergeht, gibt es auch Studien, die zeigen, dass durch die TLO-Entstehung die lokale Immunantwort gestärkt wird und es nicht zwangsläufig zu einer Gewebeschädigung kommen muss (182). Ob TLOs eher positive oder negative Effekte auf das infiltrierte Gewebe ausüben ist nicht zuletzt aufgrund des aktuell ungenügend erforschten Entstehungsmechanismus unbekannt. Bekannt ist jedoch, dass folliculäre T-Helferzellen und deren Interaktion mit B-Lymphozyten u.a. für die Entstehung von Keimzentren verantwortlich sind (165). In Keimzentren findet eine rege Kommunikation zwischen T- und B-Zellen statt. Dieser Austausch führt zur weitreichenden Aktivierung der B-Zellen und deren Transformation zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen (165,183). In den Keimzentren

findet eine Kooperation zwischen proliferierenden antigenspezifischen B-Lymphozyten, folliculären T-Helferzellen und spezialisierten folliculären dendritischen Zellen, welche die Antigene präsentieren, statt (184). Das primäre Ziel dieses Ortes ist die Produktion von Plasmazellen, welche hoch-affine Antikörper und B-Gedächtniszellen zur Sicherstellung einer zuverlässigen Immunantwort, bilden. Die Keimzentren sind demzufolge essenziell für die humorale Immunantwort (185).

So konnte in dieser Arbeit durch den Einsatz des anti-BAFF-AKs Belimumab gezeigt werden, dass weder zum früheren (d28), noch zum späteren (d56) Zeitpunkt eine Infiltration der Nierenrinde im Sinne einer TLO-Bildung stattfand, wie anhand der fehlenden B-Zellzonen illustriert werden konnte. Passend dazu konnte durch ein weiteres Projekt der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Bergler gezeigt werden, dass der B-Zell aktivierende Faktor (BAFF) für die Ausbildung von TLOs verantwortlich ist (112).

Während in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der Anzahl und der Beschaffenheit der Infiltrate lag, wurde in der inzwischen publizierten Arbeit der Arbeitsgruppe Dr. Bergler durch Frau Dr. L. Steines zudem die Größe der Infiltrate vermessen. Hierfür wurden die Infiltratbilder der Gruppen von d56 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in den Gruppen CR und CR + AK im Vergleich zu NR signifikant größere Infiltrate nachweisbar waren. In CR waren größere Infiltrate als in CR + AK zu sehen. Ein weiteres Augenmerk lag auf der Lokalisation der Infiltrate im Nierenrindengewebe. So immigrierten die lymphatischen Zellen im Nierentransplantat in absteigender Häufigkeit perivaskulär, periglomerulär und interstitiell (entsprechend kein Kontakt zu Arteriolen oder Glomeruli) (136).

#### 4.4 Ausblick und weiterführende Aspekte

Auch in den aktuellen Leitlinien der KDIGO von 2022 ist zu lesen, dass eine Schulung der PatientInnen, die sich einer Organtransplantation unterziehen, sowie deren Angehörigen, wichtig erscheint, um so die Nonadhärenz der PatientInnen bzgl. der Einnahme der immunsuppressiven Therapie zu reduzieren. Zudem wird es als sinnvoll angesehen, die PatientInnen, welche ein absehbar höheres Risiko für Incompliance aufzeigen, häufiger dahingehend zu prüfen. PatientInnen mit einer vorangegangenen Transplantatabstoßung aufgrund von Nonadhärenz sollte nicht per se eine erneute Transplantation verwehrt werden. Es sollten auch hier Schulungen zur Adhärenz durchgeführt werden (186).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde der SLE im Jahr 2021 von der DSO erstmalig auf die Liste der häufigsten Indikationen zur NTx aufgenommen. Sollte sich die Therapie mit anti-BAFF-Inhibitoren wie Belimumab in weiteren Studien durchsetzen, ist zu prüfen, ob bei bereits vor der NTx stattgefundenener Belimumabtherapie eine Fortsetzung der Applikation möglich bzw. sinnvoll erscheint.

Das Alter der PatientInnen, die eine Indikation zur Nierentransplantation aufweisen, spielt in den aktuellen Forschungsarbeiten eine immer größere Rolle, da man festgestellt hat, dass v.a. ältere Nieren TLOs ausbilden (187). Hier gilt es weiter Daten zu sammeln und diesen Aspekt mit in die immunologischen Überlegungen mit einzubeziehen.

Limitationen:

Durch eine maschinelle Erfassung der Schnitte und der maschinellen Auszählung doppelt positiver Zellen wäre eine Verbesserung der Objektivierbarkeit möglich. Das Programm Histoquest war dazu zum Zeitpunkt der Auswertung nicht befähigt. Dadurch war die Zellzuordnung aufgrund der uneindeutigen Zellgrenzen teils schwierig.

Aufgrund einer relativ kurzen Laufzeit der Versuche ist die Aussagekraft über die Spätfolgen unter den beschriebenen Therapieschemata eingeschränkt. Eine längere Laufzeit könnte eine differenziertere Aussage bzgl. der Langzeitwirkung bspw. von Belimumab auf die immigrierenden Zellen und deren Formation im Transplantat beleuchten.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der immunsuppressiven Therapie mittels Cyclosporin A und der Einsatz eines anti-BAFF-Antikörpers (Belimumab) auf die immigrierenden Lymphozyten im Rahmen der Allograftabstoßung nach Nierentransplantation untersucht. Dafür wurde an insgesamt 39 Versuchstieren eine allogene Nierentransplantation durchgeführt. Die Versuchsdauer betrug entweder 28 oder 56 Tage. Die untersuchten Versuchsgruppen untergliederten sich jeweils anhand unterschiedlicher Therapieschemata. Je eine Gruppe erhielt als Referenzgruppe eine Standardimmunsuppression (entsprach adäquaten CyA-Gaben, NR), eine weitere erhielt als Simulation des inkomplianten Patientenguts eine alternierende und unterdosierte CyA-Immunsuppression (CR), und die dritte Gruppe erhielt additiv zu der letztgenannten den anti-BAFF-Antikörper Belimumab (CR+AK). Durch die alternierende CyA-Gabe konnte eine chronische Transplantatabstoßung und DSA-Bildung induziert werden. Anschließend wurden die angefertigten Nierenschnitte nach immunhistochemischer Bearbeitung unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierbei lag der Fokus auf der Auszählung der T- und B-Lymphozyten, deren proliferative Aktivität und deren Anordnung im interstitiellen Raum der Nierenrinde.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch die alternierende Immunsuppression (in CR) im Vergleich zur Referenzgruppe (NR) zu einer vermehrten Immigration von T-, B- und proliferierenden Zellen in die Nierenrinde kam. Der Einsatz des anti-BAFF-Antikörpers (CR+AK) hatte v.a. zum späteren Zeitpunkt (d56) einen herabregulierenden Effekt auf die immigrierenden B-Lymphozyten, sowie die proliferierenden B-Lymphozyten.

An d56 zeigten sich generell weniger proliferierende Zellen als an d28. So konnte gezeigt werden, dass lediglich die Standardimmunsuppression für die Abwesenheit proliferativer Zellen sorgen konnte. Der Einfluss des anti-BAFF-AKs beschränkte sich auf nicht proliferierende B-Lymphozyten. Der Proliferationsindex wurde zur Abbildung der proliferativen Aktivität der T- und B-Lymphozyten entwickelt. Dieser fand bisher v.a. in der Onkologie Anwendung. Es wurde deutlich, dass ein höherer Prozentsatz an T-Lymphozyten im Vergleich zu B-Lymphozyten eine proliferative Aktivität zeigte.

Anschließend wurde der errechnete Proliferationsindex mit der histopathologischen Einordnung nach BANFF verglichen. So konnten analog zu den zuvor beschriebenen Sachverhalten

in den Gruppen NR d28 und d56 keine histopathologischen Veränderungen vernommen werden. In CR+AK d28 und d56 wurden Veränderungen (BANFF 4IA und 4IB bzw. 4IIB) entsprechend einer akuten TCMR vernommen.

Außerdem wurden die angefertigten Bilder der Infiltrate auf das Vorhandensein von TLOs untersucht. So waren v.a. in den Gruppen der chronischen Abstoßung an d56 TLO-Formationen zu finden. Dabei konnten in einigen der beschriebenen TLOs zusätzlich proliferierende Keimzentren beobachtet werden. Durch den anti-BAFF-AK Belimumab konnte in diesem Projekt die Ausbildung von TLO-Formationen verhindert werden. Daher ist davon auszugehen, dass, so wie auch von Thauinat et al. beschrieben, BAFF zur Ausbildung von TLOs von Nöten ist. Hierbei scheint jedoch die Kombination mit einem direkt auf die T-Lymphozyten wirkenden Immunsuppressivum (CyA) von Bedeutung zu sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Nonadhärenz bzgl. der immunsuppressiven Therapie einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausbildung von TLOs hat.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Rump C. Tätigkeitbericht 2022, Niere nach §11 Abs. 5 TPG Nierentransplantation. DSO. 2023;Tätigkeitsbericht 2022:41.
2. Protzel C, Führer A, Hakenberg OW. Terminales Nierenversagen und Indikation zur Nierentransplantation. Urol. 2015;54(10):1356–61.
3. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, u. a. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. Am J Transplant. 2011;11(10):2093–109.
4. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JLR. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. J Am Soc Nephrol JASN. 2005;16(6):1859–65.
5. Herold G, Herausgeber. Innere Medizin 2018. Köln: Gerd Herold; 2018. 640–644 S.
6. Wunderlich H, Steiner T. Nierentransplantation. In: Schmelz HU, Sparwasser C, Weidner W, Herausgeber. Facharztwissen Urologie: Differenzierte Diagnostik und Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. S. 649–58.
7. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2022. Frankfurt am Main: DSO; 2023. 128 S.
8. Deutsche Stiftung Organtransplantation. Jahresbericht - Organspende und Transplantation in Deutschland 2021. DSO. 2022;124.
9. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdge KA, Chan TM, u. a. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. Kidney Int. 2021;100(4):S1–276.
10. Levey AS, Jong PE de, Coresh J, Nahas ME, Astor BC, Matsushita K, u. a. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. Kidney Int. 2011;80(1):17–28.
11. Jager KJ, Kovesdy C, Langham R, Rosenberg M, Jha V, Zoccali C. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. Nephrol Dial Transplant. 2019;34(11):1803–5.
12. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117–71.
13. Wen CP, Cheng TYD, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, Tsai SP, u. a. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet Lond Engl*. 2008;371(9631):2173–82.
  14. Grant CH, Salim E, Lees JS, Stevens KI. Deprivation and chronic kidney disease – a review of the evidence. *Clin Kidney J*. 2023;
  15. Lindemann M, Heinold A, Lenz V, Horn P, Heinemann F. Die durchflusszytometrische Verträglichkeitsprobe – sensitivere Diagnostik zur Prädiktion von Transplantatabstößen. *Transfusionsmedizin - Immunhämatol Hämotherapie Immungenetik Zellther*. 2017;7(04):233–7.
  16. Ducreux S, Guillaud O, Bosch A, Thaunat O, Morelon E, Hervieu V, u. a. Monitoring efficiency of humoral rejection episode therapy in liver transplantation: any role for complement binding Luminex Single Antigen assays? *Transpl Immunol*. 2016;35:23–8.
  17. Stöcker W, Schlumberger W. Luminex-Assay. In: Gressner AM, Arndt T, Herausgeber. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 1538–1538. (Springer Reference Medizin).
  18. Zecher D, Bach C, Preiss A, Staudner C, Utpatel K, Evert M, u. a. Analysis of Luminex-based Algorithms to Define Unacceptable HLA Antibodies in CDC-crossmatch Negative Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*. 2018;102(6):969.
  19. Süsal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Hönger G, u. a. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens*. 2013;82(2):83–92.
  20. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280(14):735–9.
  21. Lindemann M, Nyadu B, Heinemann FM, Kribben A, Paul A, Horn PA, u. a. High negative predictive value of an amplified flow cytometry crossmatch before living donor kidney transplantation. *Hum Immunol*. 2010;71(8):771–6.
  22. Locke AF, Hickey M, Valenzuela NM, Butler C, Sosa R, Zheng Y, u. a. Virtual and Reality: An Analysis of the UCLA Virtual Crossmatch Exchanges. *Transplantation*. 2023;

23. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*. 2011;16(2):125–33.
24. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-Term Renal Allograft Survival in the United States: A Critical Reappraisal. *Am J Transplant*. 2011;11(3):450–62.
25. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-Term Renal Allograft Survival: Have we Made Significant Progress or is it Time to Rethink our Analytic and Therapeutic Strategies? *Am J Transplant*. 2004;4(8):1289–95.
26. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of Improvement in Renal Allograft Survival Despite a Marked Decrease in Acute Rejection Rates Over the Most Recent Era. *Am J Transplant*. 2004;4(3):378–83.
27. Zand MS. Immunosuppression and Immune Monitoring After Renal Transplantation. *Semin Dial*. 2005;18(6):511–9.
28. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *The Lancet*. 2011;378(9800):1428–37.
29. Wekerle T, Segev D, Lechler R, Oberbauer R. Strategies for long-term preservation of kidney graft function. *The Lancet*. 2017;389(10084):2152–62.
30. Neuberger JM, Bechstein WO, Kuypers DRJ, Burra P, Citterio F, De Geest S, u. a. Practical Recommendations for Long-term Management of Modifiable Risks in Kidney and Liver Transplant Recipients: A Guidance Report and Clinical Checklist by the Consensus on Managing Modifiable Risk in Transplantation (COMMIT) Group. *Transplantation*. 2017;101(4S):S1.
31. Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, u. a. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int*. 2018;94(5):964–73.
32. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat*. 1943;77(Pt 4):299-310.4.
33. Hatzinger M, Stastny M, Grützmacher P, Sohn M. Die Geschichte der Nierentransplantation. *Urol*. 2016;55(10):1353–9.
34. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg*. 1958;148(3):343–59.
35. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged Survival of

- Human-Kidney Homografts by Immunosuppressive Drug Therapy. *N Engl J Med.* 1963;268(24):1315–23.
36. Kaplan B, Barr ML, O’Grady J, Berezan D, Hughes G, Becker B, u. a. EDITOR-IN-CHIEF Philip F. Halloran, Canada DEPUTY EDITORS Jonathan S. Bromberg, USA Robert L. Fairchild, USA Sandy Feng, USA. 2009;
  37. Türk TR, Witzke O, Zeier M. KDIGO-Leitlinien zur Betreuung von Nierentransplantatempfängern: Deutsche Übersetzung. *Nephrol.* 2010;5(2):94–107.
  38. Hellemans R, Bosmans J -L., Abramowicz D. Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies? *Am J Transplant.* 2017;17(1):22–7.
  39. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715–29.
  40. Schamberger B, Sollinger D, Lutz J. Immunosuppressive Therapie nach Nierentransplantation. *Nephrol.* 2015;10(1):9–15.
  41. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, u. a. Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Kidney Transplants from Extended Criteria Donors (BENEFIT-EXT Study). *Am J Transplant.* 2010;10(3):547–57.
  42. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, u. a. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010;10(3):535–46.
  43. Koppula S, Yost SE, Sussman A, Bracamonte ER, Kaplan B. Successful conversion to belatacept after thrombotic microangiopathy in kidney transplant patients. *Clin Transplant.* 2013;27(4):591–7.
  44. Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(9):511–9.
  45. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, u. a. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation.* 2013;95(1):19–47.
  46. Weidemann A, Büttner M, Amann K, Wiesener M. BANFF-Klassifikation der Histologie von Nierentransplantaten und therapeutische Konsequenzen. *Nephrol.*

- 2015;10(2):113–23.
47. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, u. a. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am J Transplant*. 2014;14(2):272–83.
  48. Thongprayoon C, Vaitla P, Craici IM, Leeaphorn N, Hansrivijit P, Salim SA, u. a. The Use of Donor-Derived Cell-Free DNA for Assessment of Allograft Rejection and Injury Status. *J Clin Med*. 2020;9(5):1480.
  49. Banasik M, Boratynska M, Koscielska-Kasprzak K, Kaminska D. The influence of non-HLA antibodies directed against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) on early renal transplant outcomes. *Transpl Int*. 2014;1029–38.
  50. Bu L, Gupta G, Pai A, Anand S, Stites E, Moinuddin I, u. a. Clinical outcomes from the Assessing Donor-derived cell-free DNA Monitoring Insights of kidney Allografts with Longitudinal surveillance (ADMIRAL) study. *Kidney Int*. 2022;101(4):793–803.
  51. Martuszewski A, Paluszkiewicz P, Król M, Banasik M, Kepinska M. Donor-Derived Cell-Free DNA in Kidney Transplantation as a Potential Rejection Biomarker: A Systematic Literature Review. *J Clin Med*. 2021;10(2):193.
  52. Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, u. a. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(8):2400–3.
  53. Halloran PF, Reeve J, Madill-Thomsen KS, Demko Z, Prewett A, Billings P. The Tri-fecta Study: Comparing Plasma Levels of Donor-derived Cell-Free DNA with the Molecular Phenotype of Kidney Transplant Biopsies. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2022;33(2):387–400.
  54. Acosta-Rodríguez EV, Merino MC, Montes CL, Motrán CC, Gruppi A. Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(1):73–83.
  55. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451–62.
  56. Schmitz R, Fitch ZW, Schroder PM, Choi AY, Jackson AM, Knechtle SJ, u. a. B cells in transplant tolerance and rejection: friends or foes? *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2020;33(1):30–40.

57. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678–89.
58. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(7):546–59.
59. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 2002;186:37–46.
60. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science.* 1998;279(5349):381–4.
61. Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol.* 1996;134(1):255–66.
62. Giagulli C, Ottoboni L, Cavegion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G, u. a. The Src Family Kinases Hck and Fgr Are Dispensable for Inside-Out, Chemoattractant-Induced Signaling Regulating  $\beta$ 2 Integrin Affinity and Valency in Neutrophils, but Are Required for  $\beta$ 2 Integrin-Mediated Outside-In Signaling Involved in Sustained Adhesion1. *J Immunol.* 2006;177(1):604–11.
63. Shattil SJ. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol.* 2005;15(8):399–403.
64. Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nat Immunol.* 2004;5(4):393–400.
65. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569–75.
66. Dudenredaktion, Herausgeber. Duden | Pro-li-fe-ra-ti-on | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft. In. Verfügbar unter: <https://www.duden.de/node/115470/revision/1405307>
67. Tai YT, Li XF, Breitzkreutz I, Song W, Neri P, Catley L, u. a. Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer Res.* 2006;66(13):6675–82.
68. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, u. a. BAFF, a

- novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999;189(11):1747–56.
69. Blum KS, Pabst R. Keystones in lymph node development. *J Anat*. 2006;209(5):585–95.
  70. Luo S, Zhu R, Yu T, Fan H, Hu Y, Mohanta SK, u. a. Chronic Inflammation: A Common Promoter in Tertiary Lymphoid Organ Neogenesis. *Front Immunol*. 2019;10.
  71. Tang H, Zhu M, Qiao J, Fu YX. Lymphotoxin signalling in tertiary lymphoid structures and immunotherapy. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(10):809–18.
  72. Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, Hammad H, Lambrecht BN. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2012;33(6):297–305.
  73. Larijani M, Petrov AP, Kolenchenko O, Berru M, Krylov SN, Martin A. AID associates with single-stranded DNA with high affinity and a long complex half-life in a sequence-independent manner. *Mol Cell Biol*. 2007;27(1):20–30.
  74. Thaunat O, Graff-Dubois S, Brouard S, Gautreau C, Varthaman A, Fabien N, u. a. Immune Responses Elicited in Tertiary Lymphoid Tissues Display Distinctive Features. *PLOS ONE*. 2010;5(6):e11398.
  75. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, u. a. Evolution and Clinical Pathologic Correlations of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Post Kidney Transplant. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1157–67.
  76. Chisholm MA, Vollenweider LJ, Mulloy LL, Jagadeesan M, Wynn JJ, Rogers HE, u. a. RENAL TRANSPLANT PATIENT COMPLIANCE WITH FREE IMMUNOSUPPRESSIVE MEDICATIONS<sup>1</sup>. *Transplantation*. 2000;70(8):1240.
  77. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2004;4(3):438–43.
  78. Joosten SA, Sijpkens YWJ, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int*. 2005;68(1):1–13.
  79. Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2004;19 Suppl 3:iii38–42.

80. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
81. Solez K, Racusen LC. The Banff classification revisited. *Kidney Int.* 2013;83(2):201–6.
82. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990;171(1):307–14.
83. Jr CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Jr CAJ, Travers P, u. a. *Immunobiology.* 5th Aufl. Garland Science; 2001.
84. Cooper JE. Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020;15(3):430–8.
85. Lentine KL, Smith JM, Miller JM, Bradbrook K, Larkin L, Weiss S, u. a. OPTN/SRTR 2021 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant.* 2023;23(2):S21–120.
86. Lusco MA, Fogo AB, Najafian B, Alpers CE. *AJKD Atlas of Renal Pathology: Acute T-Cell-Mediated Rejection.* *Am J Kidney Dis.* 2016;67(5):e29–30.
87. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA, u. a. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int.* 2010;77(4):299–311.
88. Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector Mechanisms of Rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11):a015461.
89. Kamradt T. Einführung in das Immunsystem. In: Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Herausgeber. *Harrisons Innere Medizin.* 19. Auflage. Berlin: ABW Verlag; 2016.
90. Cooper JE, Gralla J, Cagle L, Goldberg R, Chan L, Wiseman AC. Inferior kidney allograft outcomes in patients with de novo donor-specific antibodies are due to acute rejection episodes. *Transplantation.* 2011;91(10):1103–9.
91. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, u. a. De Novo Donor-Specific Antibody at the Time of Kidney Transplant Biopsy Associates with Microvascular Pathology and Late Graft Failure. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2532–41.
92. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, u. a. Incidence and Impact of De Novo Donor-Specific Alloantibody in Primary Renal Allografts. *Transplantation.* 2013;95(3):410–7.

93. Mengel M, Mannon RB. Banff and ABMR: Are we going in the right direction? *Am J Transplant.* 2021;21(7):2321–2.
94. Mannon RB. The Banff schema for antibody-mediated rejection: Lost in translation? *Am J Transplant.* 2019;19(1):9–10.
95. Chong AS, Rothstein DM, Safa K, Riella LV. Outstanding questions in transplantation: B cells, alloantibodies, and humoral rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2019;19(8):2155–63.
96. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(1):182–92.
97. Barten MJ, Schulz U, Beiras-Fernandez A, Berchtold-Herz M, Boeken U, Garbade J, u. a. The clinical impact of donor-specific antibodies in heart transplantation. *Transplant Rev Orlando Fla.* 2018;32(4):207–17.
98. Xu H, He X, Xu R. B Cell Activating Factor, Renal Allograft Antibody-Mediated Rejection, and Long-Term Outcome. *J Immunol Res.* 2018;2018.
99. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival. *Am J Transplant.* 2007;7(2):408–15.
100. Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RWG. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome<sup>1</sup>. *Transplantation.* 2003;75(7):1034.
101. Wiebe C, Gareau AJ, Pochinco D, Gibson IW, Ho J, Birk PE, u. a. Evaluation of C1q Status and Titer of De Novo Donor-Specific Antibodies as Predictors of Allograft Survival. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2017;17(3):703–11.
102. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(6):348–57.
103. Kwun J, Knechtle SJ. Overcoming Chronic Rejection-Can it B? *Transplantation.* 2009;88(8):955–61.
104. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2019;32(8):775–88.

105. Jordan SC, Reinsmoen N, Peng A, Lai CH, Cao K, Villicana R, u. a. Advances in diagnosing and managing antibody-mediated rejection. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2010;25(10):2035–45.
106. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, u. a. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med.* 2012;209(5):1001–10.
107. Kamar N, Milioto O, Puissant-Lubrano B, Esposito L, Pierre MC, Mohamed AO, u. a. Incidence and predictive factors for infectious disease after rituximab therapy in kidney-transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010;10(1):89–98.
108. Eskandary F, Regele H, Baumann L, Bond G, Kozakowski N, Wahrmann M, u. a. A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2018;29(2):591–605.
109. Cabezas L, Jouve T, Malvezzi P, Janbon B, Giovannini D, Rostaing L, u. a. Tocilizumab and Active Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation: A Literature Review. *Front Immunol.* 2022;13:839380.
110. Banham GD, Flint SM, Torpey N, Lyons PA, Shanahan DN, Gibson A, u. a. Belimumab in kidney transplantation: an experimental medicine, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Lond Engl.* 2018;391(10140):2619–30.
111. Kulkarni S, Kirkiles-Smith NC, Deng YH, Formica RN, Moeckel G, Broecker V, u. a. Eculizumab Therapy for Chronic Antibody-Mediated Injury in Kidney Transplant Recipients: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2017;17(3):682–91.
112. Steines L, Poth H, Schuster A, Geissler EK, Amann K, Banas B, u. a. Anti-BAFF Treatment Interferes With Humoral Responses in a Model of Renal Transplantation in Rats. *Transplantation.* 2020;104(1):e16.
113. Spektrum. Isoantikörper. In: Spektrum, Lexikon der Biologie [Internet]. 2023 [zitiert 30. November 2023]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/isoantikoerper/34609>
114. Kitz Kramer D. antikoerper-online.de. [zitiert 30. November 2023]. *Immunhistochemie*

- (IHC). Verfügbar unter: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1216/immun-histochemie-ihc/>
115. Filippone EJ, Farber JL. The Problem of Subclinical Antibody-mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2021;Online First.
  116. Chong AS. B cells as antigen-presenting cells in transplantation rejection and tolerance. *Cell Immunol*. 2020;349:104061.
  117. Calne RY, Thiru S, McMaster P, Craddock GN, White DJ, Evans DJ, u. a. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. 1978. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1998;9(9):1751–6.
  118. Mühlfeld A, Viebahn R, Kribben A, Kurschat Ch, Huppertz A, Ivens K, u. a. *TX-Manual - DGfN*. 2023;(3. Auflage):72.
  119. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005;331(7520):810.
  120. Johnson C, Ahsan N, Gonwa T, Halloran P, Stegall M, Hardy M, u. a. Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus ciclosporine (Neoral) with mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation. *Transplantation*. 2000;69(5):834–41.
  121. Hardinger KL, Bohl DL, Schnitzler MA, Lockwood M, Storch GA, Brennan DC. A randomized, prospective, pharmacoeconomic trial of tacrolimus versus ciclosporine in combination with thymoglobulin in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2005;80(1):41–6.
  122. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and ciclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation*. 1997;63(7):977–83.
  123. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, u. a. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and ciclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation*. 1997;64(3):436–43.
  124. Halloran PF, Chang J, Famulski K, Hidalgo LG, Salazar IDR, Merino Lopez M, u. a. Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated

- Rejection in Late Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(7):1711–20.
125. Chittka D, Cherukuri A, Sharma A, Mehta R, Hariharan S, Rothstein DM. DSA plus TCMR Leads to Poor Outcomes in Renal Allograft Recipients and this is Markedly Exacerbated by Non-Adherence. *Transplantation*. 2018;102:25.
  126. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, u. a. Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *Am J Transplant*. 2009;9(3):527–35.
  127. Burnier M, Wuerzner G, Struijker-Boudier H, Urquhart J. Measuring, analyzing, and managing drug adherence in resistant hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2013;62(2):218–25.
  128. Tong A, Howell M, Wong G, Webster AC, Howard K, Craig JC. The perspectives of kidney transplant recipients on medicine taking: a systematic review of qualitative studies. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2011;26(1):344–54.
  129. Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW. Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transpl Immunol*. 1993;1(1):77–81.
  130. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429–42.
  131. Choy EH, Kavanaugh AF, Jones SA. The problem of choice: current biologic agents and future prospects in RA. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(3):154–63.
  132. Furie R, Rovin BH, Houssiau F, Malvar A, Teng YKO, Contreras G, u. a. Two-Year, Randomized, Controlled Trial of Belimumab in Lupus Nephritis. *N Engl J Med*. 2020;383(12):1117–28.
  133. Furie R, Petri M, Zamani O, Cervera R, Wallace DJ, Tegzová D, u. a. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011;63(12):3918–30.
  134. Navarra SV, Guzmán RM, Gallacher AE, Hall S, Levy RA, Jimenez RE, u. a. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2011;377(9767):721–31.

135. Gandolfo S. Double anti-B cell and anti-BAFF targeting for the treatment of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;
136. Steines L, Poth H, Herrmann M, Schuster A, Banas B, Bergler T. B Cell Activating Factor (BAFF) Is Required for the Development of Intra-Renal Tertiary Lymphoid Organs in Experimental Kidney Transplantation in Rats. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21).
137. Scott LJ, Burness CB, McCormack PL. Belimumab: a guide to its use in systemic lupus erythematosus. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*. 2012;26(3):195–9.
138. Blair HA, Duggan ST. Belimumab: A Review in Systemic Lupus Erythematosus. *Drugs*. 2018;78(3):355–66.
139. Salama AD, Pusey CD. Drug insight: rituximab in renal disease and transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006;2(4):221–30.
140. Genberg H, Hansson A, Wernerson A, Wennberg L, Tydén G. Pharmacodynamics of rituximab in kidney allotransplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006;6(10):2418–28.
141. Thauinat O, Patey N, Gautreau C, Lechaton S, Fremeaux-Bacchi V, Dieu-Nosjean MC, u. a. B Cell Survival in Intra-graft Tertiary Lymphoid Organs After Rituximab Therapy. *Transplantation*. 2008;85(11):1648–53.
142. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, u. a. Antibody-Mediated Rejection Criteria – an Addition to the Banff '97 Classification of Renal Allograft Rejection. *Am J Transplant*. 2003;3(6):708–14.
143. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P, u. a. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*. 2009;87(10):1505–13.
144. van Timmeren MM, Lems SPM, Hepkema BG, Bakker SJL. Anti-Human Leukocyte Antigen Antibodies and Development of Graft Failure After Renal Transplantation. *Transplantation*. 2009;88(12):1399–400.
145. Pongpirul W, Chanchaoenthana W, Pongpirul K, Leelahavanichkul A, Kittikowit W, Jutivorakool K, u. a. B-cell activating factor, a predictor of antibody mediated rejection in kidney transplantation recipients. *Nephrology*. 2018;23(2):169–74.
146. Gosset C, Viglietti D, Rabant M, Vérine J, Aubert O, Glotz D, u. a. Circulating donor-

- specific anti-HLA antibodies are a major factor in premature and accelerated allograft fibrosis. *Kidney Int.* 2017;92(3):729–42.
147. Muller YD, Ghaleb N, Rotman S, Vionnet J, Halfon M, Catana E, u. a. Rituximab as monotherapy for the treatment of chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2018;31(4):451–5.
  148. Grafft CA, Cornell LD, Gloor JM, Cosio FG, Gandhi MJ, Dean PG, u. a. Antibody-mediated rejection following transplantation from an HLA-identical sibling. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2010;25(1):307–10.
  149. Dragun D, Hegner B. Non-HLA Antibodies Post-Transplantation: Clinical Relevance and Treatment in Solid Organ Transplantation. 2008;
  150. Sigdel TK, Sarwal MM. Moving Beyond HLA: A Review of nHLA Antibodies in Organ Transplantation. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1486–90.
  151. Crespo M, Llinàs-Mallol L, Redondo-Pachón D, Butler C, Gimeno J, Pérez-Sáez MJ, u. a. Non-HLA Antibodies and Epitope Mismatches in Kidney Transplant Recipients With Histological Antibody-Mediated Rejection. *Front Immunol.* 2021;12.
  152. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, Hsieh SC, Dai H, Bagnasco S, u. a. Endothelial cell antibodies associated with novel targets and increased rejection. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(5):1161–71.
  153. Sablik KA, Groningen MCC van, Looman CWN, Damman J, Roelen DL, Agteren M van, u. a. Chronic-active antibody-mediated rejection with or without donor-specific antibodies has similar histomorphology and clinical outcome – a retrospective study. *Transpl Int.* 2018;31(8):900–8.
  154. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, u. a. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2009;9(11):2520–31.
  155. Sis B, Jhangri GS, Riopel J, Chang J, de Freitas DG, Hidalgo L, u. a. A new diagnostic algorithm for antibody-mediated microcirculation inflammation in kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012;12(5):1168–79.
  156. Baid-Agrawal S, Farris AB, Pascual M, Mauiyyedi S, Farrell ML, Tolckoff-Rubin N, u. a. Overlapping pathways to transplant glomerulopathy: chronic humoral rejection, hepatitis C infection, and thrombotic microangiopathy. *Kidney Int.* 2011;80(8):879–85.

157. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, u. a. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol.* 1991;86(3):464–70.
158. Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* Juni 2004;19 Suppl 3:iii38-42.
159. Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, Famulski KS, Hidalgo LG, MengeL M, u. a. An integrated view of molecular changes, histopathology and outcomes in kidney transplants. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2010;10(10):2223–30.
160. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, u. a. Evidence for Antibody-Mediated Injury as a Major Determinant of Late Kidney Allograft Failure. *Transplantation.* 2010;90(1):68.
161. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, u. a. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011;11(11):2405–13.
162. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive cross-match kidney transplant recipients treated with eculizumab: outcomes beyond 1 year. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2015;15(5):1293–302.
163. Heidt S, Roelen DL, Eijssink C, Eikmans M, van Kooten C, Claas FHH, u. a. Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin Exp Immunol.* Februar 2010;159(2):199–207.
164. *Harrisons Innere Medizin. Register: Innere Medizin. 19. Auflage, in Zusammenarbeit mit der Charité. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2016. 180 S.*
165. Kwun J, Manook M, Page E, Burghuber C, Hong J, Knechtle SJ. Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation.* 2017;101(4):704–12.
166. van der Zwan M, Hesselink DA, van den Hoogen MWF, Baan CC. Costimulation Blockade in Kidney Transplant Recipients. *Drugs.* 2020;80(1):33–46.

167. Masson P, Henderson L, Chapman JR, Craig JC, Webster AC. Belatacept for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;2014(11):CD010699.
168. Durrbach A, Pestana JM, Florman S, del Carmen Rial M, Rostaing L, Kuypers D, u. a. Long-Term Outcomes in Belatacept- Versus Cyclosporine-Treated Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys: Final Results From BENEFIT-EXT, a Phase III Randomized Study. *Am J Transplant.* 2016;16(11):3192–201.
169. Tse GH, Johnston CJC, Kluth D, Gray M, Gray D, Hughes J, u. a. Intrarenal B Cell Cytokines Promote Transplant Fibrosis and Tubular Atrophy. *Am J Transplant.* 2015;15(12):3067–80.
170. Bosch F, López-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, u. a. Mantle cell lymphoma. *Cancer.* 1998;82(3):567–75.
171. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, u. a. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1504–13.
172. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, u. a. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003;112(2):286–97.
173. Nobari ST, Nojadeh JN, Talebi M. B-cell maturation antigen targeting strategies in multiple myeloma treatment, advantages and disadvantages. *J Transl Med.* 2022;20(1):82.
174. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, u. a. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2020;20(9):2318–31.
175. Jones GW, Hill DG, Jones SA. Understanding Immune Cells in Tertiary Lymphoid Organ Development: It Is All Starting to Come Together. *Front Immunol.* 2016;7.
176. Thaunat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y, u. a. Chronic Rejection Triggers the Development of an Aggressive Intra-graft Immune Response through Recapitulation of Lymphoid Organogenesis. *J Immunol.* 2010;185(1):717–28.
177. Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG. Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005;5(3):510–6.

178. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(7):447–62.
179. Bath NM, Ding X, Verhoven BM, Wilson NA, Coons L, Sukhwal A, u. a. Autoantibody production significantly decreased with APRIL/BLyS blockade in murine chronic rejection kidney transplant model. *PloS One*. 2019;14(10):e0223889.
180. Thauinat O, Field AC, Dai J, Louedec L, Patey N, Bloch MF, u. a. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(41):14723–8.
181. Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, u. a. Lymphatic Neoangiogenesis in Human Kidney Transplants Is Associated with Immunologically Active Lymphocytic Infiltrates. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(3):603.
182. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol*. 2011;41(1):89–96.
183. Kräutler NJ, Suan D, Butt D, Bourne K, Hermes JR, Chan TD, u. a. Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *J Exp Med*. 2017;214(5):1259–67.
184. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(5):898–907; quiz 908–9.
185. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016;45(3):471–82.
186. Morath C, Zeier M. KDIGO-Leitlinie zu Evaluation und Management von Nierentransplantationskandidaten: Kommentierte deutsche Übersetzung der Zusammenfassung. *Nephrol*. 2022;17(1):44–50.
187. Sato Y, Tamura M, Yanagita M. Tertiary lymphoid tissues: a regional hub for kidney inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. 2023;38(1):26–33.
188. Loupy A, Haas M, Roufosse C, Naesens M, Adam B, Afrouzian M, u. a. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell– and antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2020;20(9):2318–31.

## 7 Anhang

### 7.1 Publikation

Im Rahmen einer Publikation im International Journal of Molecular Science wurden im Vorfeld (Oktober 2020) Teile der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse publiziert (doi: [10.3390/ijms21218045](https://doi.org/10.3390/ijms21218045)).

#### **B Cell Activating Factor (BAFF) Is Required for the Development of Intra-Renal Tertiary Lymphoid Organs in Experimental Kidney Transplantation in Rats**

Louisa Steines, Helen Poth, Marlene Herrmann, Antonia Schuster, Bernhard Banas, Tobias Bergler

##### **Abstract**

*Intra-renal tertiary lymphoid organs (TLOs) are associated with worsened outcome in kidney transplantation (Ktx). We used an anti-BAFF (B cell activating factor) intervention to investigate whether BAFF is required for TLO formation in a full MHC-mismatch Ktx model in rats. Rats received either therapeutic immunosuppression (no rejection, NR) or subtherapeutic immunosuppression (chronic rejection, CR) and were sacrificed on d56. One group additionally received an anti-BAFF antibody (CR + AB). Intra-renal T (CD3<sup>+</sup>) and B (CD20<sup>+</sup>) cells, their proliferation (Ki67<sup>+</sup>), and IgG<sup>+</sup> plasma cells were analyzed by immunofluorescence microscopy. Formation of T and B cell zones and TLOs was assessed. Intra-renal expression of TLO-promoting factors, molecules of T:B crosstalk, and B cell differentiation was analyzed by qPCR. Intra-renal B and T cell zones and TLOs were detected in CR and were associated with elevated intra-renal mRNA expression of TLO-promoting factors, including CXCL13, CCL19, lymphotoxin- $\beta$ , and BAFF. Intra-renal plasma cells were also elevated in CR. Anti-BAFF treatment significantly decreased intra-renal B cell zones and TLO, as well as intra-renal B cell-derived TLO-promoting factors and B cell differentiation markers. We conclude that BAFF-dependent intra-renal B cells promote TLO formation and advance local adaptive alloimmune responses in chronic rejection.*

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nierentransplantationen in Deutschland 2013-2022 (DSO 2023, Quelle: Eurotransplant (1)) .....	9
Abbildung 2: B-Lymphozyten Einfluss auf das Transplantat. Abb. nach Schmitz et al. (56).	19
Abbildung 3: Pathogenese der ABMR und potenzielle Angriffspunkte (104) .....	28
Abbildung 4: Modell des experimentellen Designs, Belimumab als anti-BAFF-AK. Abb. nach Steines et al. (112).....	34
Abbildung 5: Übersicht über das weitere Vorgehen .....	36
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Immunhistochemie .....	39
Abbildung 7: Schematischer Überblick der bearbeiteten Nierenrinde.....	42
Abbildung 8: Beispiel zur Veranschaulichung der Färbungen, 20-facher Zoom .....	43
Abbildung 9: Anzahl CD3 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm <sup>2</sup> ) .....	45
Abbildung 10: Anzahl CD3 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm <sup>2</sup> )	48
Abbildung 11: Anzahl CD20 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm <sup>2</sup> ) .....	49
Abbildung 12: Anzahl CD20 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm <sup>2</sup> )	52
Abbildung 13: Anzahl Ki67 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf GFs (in mm <sup>2</sup> ).....	54
Abbildung 14: Anzahl Ki67 <sup>+</sup> Zellen im Vergleich - in Bezug auf die Infiltratfläche (in mm <sup>2</sup> )	56
Abbildung 15: Anzahl proliferierender T- und B-Lymphozyten .....	58
Abbildung 16: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse .....	63
Abbildung 17: Beispielbilder zur Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen. Aus der Gruppe CR d56.....	64
Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen anhand der Präparate von d28.....	65
Abbildung 19: Beispielhafte Darstellung der Anordnung immigrierter Zellen anhand der Präparate von d56.....	66

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO .....	10
Tabelle 2: Methoden zur immunologischen Risikoabschätzung nach Lindemann (15) .....	12
Tabelle 3: Übersicht verwendeter Geräte .....	31
Tabelle 4: Übersicht verwendeter Software .....	31
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Kits .....	31
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Lösungen .....	32
Tabelle 7: Übersicht verwendeter Arzneimittel .....	32
Tabelle 8: Auflistung der betrachteten Gruppen .....	33
Tabelle 9: Verwendete Antikörper, Zielmolekül CD3 <sup>+</sup> Zellen .....	37
Tabelle 10: Verwendete Antikörper, Zielmolekül CD20 <sup>+</sup> Zellen .....	38
Tabelle 11: Verwendete Antikörper, Zielmolekül Ki67 <sup>+</sup> Zellen .....	38
Tabelle 12: Färbung Zellkerne .....	38
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten fluoreszierenden Färbemittel und die dadurch sichtbar werdenden Zellbestandteile bzw. -arten .....	43
Tabelle 14: Zusammenfassung CD3 <sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand der GF-Flächen .....	47
Tabelle 15: Zusammenfassung CD3 <sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand von Infiltraten .....	49
Tabelle 16: Zusammenfassung CD20 <sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand der GF-Flächen .....	51
Tabelle 17: Zusammenfassung CD20 <sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand von Infiltraten .....	53
Tabelle 18: Zusammenfassung Ki67 <sup>+</sup> Zellen, Vergleiche anhand der GF-Flächen .....	56
Tabelle 19: Zusammenfassung Ki67 <sup>+</sup> Zellen, Vergleich anhand von Infiltraten .....	57
Tabelle 20: Proliferationsindex anhand von Infiltraten, Darstellung der Mittelwerte .....	59
Tabelle 21: Proliferative Aktivität und histopathologische Einordnung anhand der BANFF-Klassifikation .....	61
Tabelle 22: BANFF-Klassifikation nach Update 2019, nach (187) .....	108

## 7.4 BANFF-Klassifikation

Kategorie	Erläuterung/Typ
Banff 1	Normalbefund oder unspezifische Veränderungen
Banff 2	<b>Antikörper-vermittelte Rejektion</b>
	<b>Typ I – aktive ABMR</b>
	<p>Alle 3 der folgenden Merkmale müssen für die Diagnosestellung vorliegen:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Histologischer Nachweis eines akuten Gewebeschadens inkl. min. 1 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>Mikrovaskuläre Inflammation o. Glomerulonephritis</li> <li>Intimale oder transmurale Arteriitis</li> <li>akute thrombotische Mikroangiopathie (TMA) – ohne andere Ursache</li> <li>akuter Tubulusschaden – ohne andere Ursache</li> </ul> </li> <li>Nachweis aktueller/kürzlicher AK-Interaktionen mit dem Gefäßendothel inkl. min. 1 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>C4d pos.</li> <li>min. mittelgradige mikrovaskuläre Inflammation ohne de novo Glomerulonephritis</li> <li>Vermehrte Expression von Gentranskripten im Biopsiegewebe</li> </ul> </li> <li>Serologischer Nachweis zirkulierender DSA; C4d-Färbung gemäß 2. Kann die DSA ersetzen.</li> </ol>
	<b>Typ II – chronisch aktive ABMR</b>
<p>Alle 3 der folgenden Merkmale müssen für die Diagnosestellung vorliegen:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Morphologischer Nachweis eines chron. Transplantatschadens inkl. min. 1 der folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> <li>Transplantatglomerulopathie ohne Anzeichen für chronische TMA o. chron. rezidivierende/ de novo Glomerulonephritis</li> <li>schwere peritubuläre Mehrschichtung der kapillären Basalmembran (über Elektronenmikroskop nachgewiesen)</li> <li>neue auftretende arterielle Intimafibrose – ohne andere Ursache</li> </ul> </li> <li>Vgl. Kriterium 2 Typ I</li> <li>Vgl. Kriterium 3 Typ I, Empfehlung zur DSA-Testung, wenn Punkt 1+2 zutreffen</li> </ol>	
<b>Typ III – chronisch (inaktive) ABMR</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>Transplantatglomerulopathie und/oder erhöhter Wert für mehrschichtige peritubuläre Basalmembran</li> <li>Fehlen des Kriteriums 2 aus Banff 2 Typ I &amp; II</li> <li>Bereits stattgehabte akute bzw. chronisch aktive ABMR o. früherer Nachweis von DSA</li> </ol>	

Banff 3	<b>Borderline Abstoßung (zellulär)</b>	
	1. Tubulitisherde m. leichter interstitieller Entzündung o. leichter Tubulitis und mittelschwere interstitielle Entzündung 2. Keine intimale o. transmurale Arteriitis	
Banff 4	<b>T-Zell-vermittelte Abstoßung</b>	
	<b>Akute TCMR – Einteilung nach Schweregraden</b>	
	Typ IA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interstitielle Inflammation in &gt; 25% des nicht-sklerotischen kortikalen Parenchyms</li> <li>- Mäßige Tubulitis von 1 o. mehreren Tubuli ohne starke Tubulusatrophie</li> </ul>
	Typ IB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interstitielle Inflammation in &gt; 25% des nicht-sklerotischen kortikalen Parenchyms</li> <li>- Schwere Tubulitis von 1 o. mehreren Tubuli ohne starke Tubulusatrophie</li> </ul>
	Typ IIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Leichte bis mittelschwere Intimaarteriitis</li> <li>- Mit/ohne interstitieller Entzündung</li> <li>- Und/oder Tubulitis</li> </ul>
	Typ IIB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schwere Intimaarteriitis</li> <li>- Mit/ohne interstitielle Entzündung</li> <li>- Und/oder Tubulitis</li> </ul>
	Typ III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transmurale Arteriitis</li> <li>- Und/oder arterielle Fibrinoidnekrose m. Beteiligung der medialen glatten Muskulatur</li> <li>- Begleitende Intimaarteriitis der mononukleären Zellen</li> <li>- Mit/ohne interstitieller Entzündung</li> <li>- Und/oder Tubulitis</li> </ul>
	<b>Chronisch aktive TCMR – Einteilung nach Schweregraden</b>	
	Typ IA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interstitielle Inflammation in &gt;25% d. sklerotischen kortikalen Parenchyms</li> <li>- Plus interstitielle Inflammation in 25% des gesamten kortikalen Parenchyms</li> <li>- Mäßige Tubulitis (Beteiligung 1 o. mehrerer Tubuli ohne starke Atrophie der Tubuli)</li> <li>- Ohne H.a. weitere bekannte Ursachen einer i-IFTA</li> </ul>
	Typ IB	<ul style="list-style-type: none"> <li>- interstitielle Inflammation in &gt;25% d. sklerotischen kortikalen Parenchyms</li> <li>- Plus interstitielle Inflammation in &gt;25% des gesamten kortikalen Parenchyms</li> <li>- schwerer Tubulitis (Beteiligung 1 o. mehrerer Tubuli ohne starke Atrophie der Tubuli)</li> </ul>

		- Ohne H.a. weitere bekannte Ursachen einer i-IFTA
	Typ II	- Chronische Allograft-Arteriopathie mit - arterieller Intimafibrose - mononukleärer Zellentzündung bei Fibrose - Bildung von Neointima  mögliche Manifestation einer chronisch aktiven o. chronischen ABMR oder mixed ABMR/TCMR
Banff 5	Polyomavirus-Nephropathie (PVN) – 3 Klassen	
Banff 6	Nicht Rejektions-bedingte Veränderungen	

Tabelle 22: BANFF-Klassifikation nach Update 2019, nach (188)

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Marlene Lucia Herrmann, geboren am 29.08.1993 in Schweinfurt, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 01.12.23

Marlene Lucia Herrmann

## 9 Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. med. Tobias Bergler für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung in allen Phasen der Dissertation, zunächst aus der Nähe und zuletzt aus der Ferne. Besonders die stets zeitnahen Rückmeldungen und Anregungen empfand ich als äußerst hilfreich und wertvoll.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. Louisa Steines und dem Laborteam aus der Abteilung für Nephrologie des Universitätsklinikums Regensburg, und hierbei v.a. bei Stephanie Ellmann, für die Unterstützung und Mitarbeit bedanken. Sie standen mir während meiner Zeit im Labor und darüber hinaus bei Fragen jederzeit zur Verfügung.

Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Banas, dem Leiter der Abteilung für Nephrologie des Universitätsklinikums Regensburg, danke ich für die Möglichkeit zur Promotion in der von ihm geführten Abteilung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Jens Werner bedanke ich mich für die Unterstützung als Zweitgutachter.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir jederzeit liebevoll und unterstützend zur Seite stehen. Ein genauso großer Dank geht an meine Schwestern, meinen Partner, sowie meine Freunde, die mich auf meinem Weg zur Vollendung der Promotionsarbeit immer wieder motiviert haben.

## **10 Lebenslauf**